



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V  
PRAZE

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra biomedicínské techniky

Aplikace mikrovlnné hypertermie na nádory myší  
ošetřených nanočásticemi oxidu železa

Application of microwave hyperthermia to mice tumors  
treated with ferric nanoparticles

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Vedoucí: prof. Ing. Jan Vrba, CSc.

Konzultant: MUDr. Luca Vannucci, Ph.D.

Bc. Hana Hadravová

---

Kladno 2018



Katedra přírodovědných oborů

Akademický rok: 2017/2018

## Z a d á n í   d i p l o m o v é   p r á c e

Student: **Bc. Hana Hadravová**  
Studijní obor: **Přístroje a metody pro biomedicínu**  
Téma: **Aplikace mikrovlnné hypertermie na nádory myši ošetřených nanočásticemi oxidu železa**  
Téma anglicky: **Application of microwave hyperthermia to mice tumors treated with ferric nanoparticles**

### Zásady pro vypracování:


Realizujte mikrovlnný aplikátor pro frekvenci 2,45 GHz dle existujícího návrhu [1] a proveďte měření jím vytvořeného SAR ve fantomu svalové tkáně. Pomocí realizovaného aplikátoru proveďte mikrovlnnou expozici nádorů myši ošetřených nanočásticemi oxidu železa. Během experimentu zaznamenejte časový průběh teploty v nádoru. Dále vyhodnoťte účinek expozice na obecnou a lokální imunitu exponovaných myší.

### Seznam odborné literatury:

[1] Paolo Togni, Microwave Applicators for Medical and Biological Purposes, 2009, Ph.D. Thesis, CTU in Prague.

Vedoucí: **prof. Ing. Jan Vrba, CSc.**  
Konzultant: **MUDr. Luca Vannucci, Ph.D.**

Zadání platné do: **20.09.2019**

  
vedoucí katedry / pracoviště

  
děkan

V Kladně dne 23.10.2017



## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Aplikace mikrovlnné hypertermie na nádory myší ošetřených nanočásticemi oxidu železa“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

*Kladno, 17. 5. 2018*

---

Hana Hadravová

## PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Prof. Ing. Janu Vrbovi, CSc. za poskytnutí cenných rad, ochotu, trpělivost a možnost zabývat se zvolenou tematikou. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Lucovi Vannuccimu, Ph.D. za systematickou podporu při řešení biologické části práce a poskytnutí zázemí imunologické laboratoře Mikrobiologického ústavu AV ČR. Velké díky patří též Ing. Iljovi Merunkovi, za pomoc s přípravou aplikátoru a softwarovými simulacemi. Děkuji Mgr. Fabiánovi Čajovi, Ph.D. za pomoc při ELISA testu, RNDr. Pavlovi Lukáčovi děkuji za pomoc při kultivaci buněk. Mgr. Lence Rajsiglové a Ing. Jaroslavě Vosmíkové bych ráda poděkovala za asistenci při práci se zvířaty. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému manželovi Ing. Michalovi Hadravovi za pomoc s prací v systému  $\LaTeX$  a celé rodině za trpělivost a podporu při studiu.



## ABSTRAKT

Práce se zabývá optimalizací hypertermické léčby nádorových onemocnění pomocí superparamagnetických nanočástic. Superparamagnetické nanočástice ve formě koloidního roztoku umístěné v nádorové tkáni a vystavené střídavému magnetickému poli generují teplo v důsledku periodicky se opakujících změn magnetického pole, což následně způsobí ohřev nanočástic i jejich blízkého okolí. Tímto způsobem je rychleji dosažen požadovaný teplotní interval, ve kterém dochází k biologickým jevům vedoucím k redukci nádoru, a zároveň je docíleno více selektivního ohřevu.

V rámci této diplomové práce byl realizován mikrovlnný planární aplikátor pro frekvenci 2,45 GHz. Bylo provedeno měření SAR ve fantomu svalové tkáně s výsledkem, že biologická tkáň s aplikovanými nanočásticemi se ohřívá rychleji než samotná biologická tkáň. A také bylo prostudováno chování superparamagnetických nanočástic za účelem optimalizace hypertermické léčby nádorových onemocnění.

Vliv přítomnosti nanočástic byl testován v několika experimentech u myší. V rámci těchto experimentů byl popsán průběh teploty při hypertermii pro myši ošetřené nanočásticemi ve srovnání s myšmi kontrolními. Rovněž byl vyhodnocen vliv nanočástic na syntézu cytokinů.

Za přínos této diplomové práce, který vyplynul z průběhu práce, je také možné považovat návrh vhodné metodologie experimentů pro studium účinku nanočástic na biologické tkáně a také studium možnosti optimalizovat hypertermickou léčbu nádorových onemocnění s pomocí těchto nanočástic.

### Klíčová slova

hypertermie, superparamagnetické nanočástice, tepelné poškození buněk.

## ABSTRACT

The thesis deals with the optimization of hyperthermic treatment of tumors with superparamagnetic nanoparticles. Superparamagnetic nanoparticles in the form of a colloidal solution placed in tumor tissue and subjected to alternating magnetic field generate heat as a result of periodically recurring changes in the magnetic field, which subsequently causes the nanoparticles to be heated and their surroundings nearby is thus heated as well. In this way, the desired temperature interval is achieved more rapidly, in which there are biological effects leading to tumor reduction, and the effect is more localized.

In this diploma thesis a microwave planar applicator for 2,45 GHz frequency was realized. SAR measurements were made in the phantom of the muscle tissue, with the result that the biological tissue with applied nanoparticles heated faster than the biological tissue itself. And as well, the behavior of superparamagnetic nanoparticles was studied to optimize hyperthermia cancer treatment.

The effect of nanoparticle presence was tested in several experiments in mice. These experiments described the course of hyperthermia temperature for nano-treated mice as compared to control mice. The effect of nanoparticles on cytokine synthesis was also evaluated.

As a contribution of this diploma thesis, it is also possible to consider the design of a suitable methodology for experiments to study the effect of nanoparticles on biological tissues as well as the possibility of optimizing the hyperthermal treatment of tumor diseases with the help of these nanoparticles.

## Keywords

hyperthermia, superparamagnetic nanoparticles, heat cell damage.

# OBSAH

---

1	ÚVOD	1
2	SHRNUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ	3
2.1	Biologie nádoru	3
2.1.1	Mikroprostředí nádoru	4
2.1.2	Protinádorová imunitní reakce	5
2.2	Biologické účinky hypertermie	7
2.2.1	Tepelné účinky	7
2.2.2	Netepelné účinky	8
2.2.3	Změny perfuze a okysličování	8
2.2.4	Indukce buněčné smrti	9
2.2.5	Inhibice oprav DNA	9
2.2.6	Stimulace imunity	10
2.3	Technická hlediska hypertermie	11
2.3.1	Hypertermické aplikátory	11
2.3.2	Termometrická zařízení	14
2.4	Magnetické vlastnosti materiálů	16
2.4.1	Domény	16
2.4.2	Interakce mezi magnetickými momenty v látce	16
2.4.3	Dělení magnetických materiálů	17
2.4.4	Diamagnetismus	18
2.4.5	Paramagnetismus	18
2.4.6	Feromagnetismus	19
2.4.7	Antiferomagnetismus	19
2.4.8	Ferimagnetismus	20
2.5	Nanometrický magnetismus	20
2.5.1	Superparamagnetismus	21
2.5.2	Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION)	22
2.5.3	Strukturní formy oxidů železa	22
2.5.4	Magnetické vlastnosti nanočástic oxidu železa	23
2.6	Mechanismus vzniku tepla	23



2.6.1	Magnetická hystereze	24
2.6.2	Néelova relaxace	26
2.6.3	Ohřev Brownovým pohybem	26
2.7	Teoretický základ pro metodologii	27
2.7.1	Definice SAR	27
2.7.2	Kultivace buněk	28
2.7.3	Možnosti aplikace magnetických částic	29
2.7.4	Cytokiny	30
3	CÍLE A HYPOTÉZY	32
4	METODY	33
4.1	Simulace rozložení SAR	33
4.2	Výroba aplikátoru	36
4.3	Experimentální modelování teplotní distribuce	37
4.3.1	Model (fantom) svalové tkáně	37
4.3.2	Určení parametrů pro aplikátory a fantomy	37
4.3.3	Ověření teplotní distribuce	37
4.4	Ověření tepelného efektu nanočástic	38
4.5	Kultivace nádorových buněk	40
4.6	Aplikace superparamagnetických nanočástic do nádoru	42
4.6.1	Ověření koncentrace cytokinů	44
5	VÝSLEDKY	48
5.1	Výsledky simulací	48
5.2	Výsledky experimentálního měření distribuce SAR	55
5.3	Efekt nanočástic na průběh teploty	56
5.4	Výsledky testu ELISA	57
6	DISKUZE	59
7	ZÁVĚR	61
	BIBLIOGRAFIE	63

## SEZNAM OBRÁZKŮ

---

Obrázek 2.1	Schéma uspořádání termoterapeutické soupravy [36]	11
Obrázek 2.2	Schématická reprezentace doménové struktury ve feromagnetických materiálech [26]	19
Obrázek 2.3	Schématická reprezentace doménové struktury ve ferimagnetických materiálech [26]	20
Obrázek 2.4	Hysterézní smyčka [27]	25
Obrázek 4.1	Model vyrobeného aplikátoru	34
Obrázek 4.2	Model aplikátoru typu motýlek	35
Obrázek 4.3	Model štěrbinového aplikátoru	36
Obrázek 4.4	Schéma štěrbinového aplikátoru [29]	36
Obrázek 4.5	Vektorový analyzátor Keysight FieldFox	38
Obrázek 4.6	Sonda DAK 12	39
Obrázek 4.7	Distribuce nanočástic v želatinovém fantomu při jednom z pokusů	39
Obrázek 4.8	Distribuce nanočástic v želatinovém fantomu při jiném z pokusů	40
Obrázek 4.9	Další metoda experimentálního nastavení (agarový fantom)	41
Obrázek 4.10	Vítězné experimentální nastavení	41
Obrázek 4.11	Buňky CT26, 80x	42
Obrázek 4.12	Experimentální nastavení s laboratorním zvířetem	43
Obrázek 4.13	Kalibrační řada	45
Obrázek 4.14	Standartní křivka pro IL-1 $\beta$	46
Obrázek 4.15	Standartní křivka pro IL-2	46
Obrázek 4.16	Standartní křivka pro IL-10	47
Obrázek 4.17	Standartní křivka pro TNF- $\alpha$	47
Obrázek 5.1	Parametr S11	49
Obrázek 5.2	Profil SAR v souřadnicích XZ	51
Obrázek 5.3	Profil SAR v souřadnicích YZ	52
Obrázek 5.4	Profil SAR v souřadnicích XY v hloubce 5 mm	53
Obrázek 5.5	Profil SAR v souřadnicích XY v hloubce 10 mm	54

Obrázek 5.6	Vyrobený aplikátor	55
Obrázek 5.7	Aplikátor typu motýlek	55
Obrázek 5.8	Štěrbínový aplikátor	55
Obrázek 5.9	Teplotní profil v agaru po expozici pomocí aplikátoru typu motýlek	56
Obrázek 5.10	Ověření tepelného efektu nanočástic ve fantomu	56
Obrázek 5.11	Ověření tepelného efektu nanočástic v nádoru v hloubce 3 mm (nahore) a 15 mm (dole).	57
Obrázek 5.12	Koncentrace IL-1 $\beta$	57
Obrázek 5.13	koncentrace IL-2	58
Obrázek 5.14	Koncentrace IL-10	58
Obrázek 5.15	Koncentrace TNF- $\alpha$	58
Obrázek 6.1	Agregované nanočástice	60

## SEZNAM TABULEK

---

Tabulka 2.1	Měření cytokiny [18]	31
Tabulka 5.1	Dielektrické parametry testovaných fantomů	48



## ÚVOD

---

Rakovina (zhoubné nádorové onemocnění) postihuje lidi všech věkových kategorií po celém světě [24]. To je jedním z důvodů, proč se výzkum zaměřuje stále na nové metody léčby a aspiruje k optimalizaci metod stávajících. Rakovina je komplexním onemocněním. Postihuje somatické buňky a způsobuje významné biochemické a biologické změny jejich okolí, které vedou k ovlivnění biochemie celého těla. Onkologické nálezy mohou mít různý charakter např. dle druhu postižených buněk nebo stadia onemocnění [28]. Existuje proto několik způsobů léčby: chirurgická, radiační, hormonální, chemoterapie, biologická terapie (hypertermie) a další. Velmi často se rovněž využívají kombinace různých druhů léčby. Klinické testy potvrzují, že při kombinaci radioterapie a hypertermie lze dosáhnout podstatně lepších výsledků než při léčbě samotnou radioterapií [10]. K chirurgickému zákroku se nejčastěji přistupuje v případě pevného nádoru.

Hypertermie je exogenní, suprafyziologické zvýšení teploty v léčené oblasti. Tato metoda využívá větší citlivosti nádorových buněk vůči vyšším teplotám, než je běžná teplota těla [36]. Počátky hypertermie sahají až do roku 1700, kdy bylo opakovaně pozorováno dočasné zlepšení zhoubných nádorů v souvislosti s průvodní bakteriální infekcí. Tento efekt byl poprvé systematicky zkoumán na přelomu 19. století. Pacienti s chirurgicky neodstranitelnými zhoubnými nádory dostali injekci bakteriálních vakcín pro navození horečky. Celková míra úspěšnosti léčby byla 20 %. Technický vývoj lokální/regionální aplikace tepla trval několik desetiletí, než se hypertermie jako taková stala dostupnou pro klinické aplikace.

V současné době se hypertermie (HT) buď aplikuje nezávisle nebo častěji v kombinaci s radioterapií (RT) nebo chemoterapií (CT). HT samotná se používá k přímému odstranění jednotlivých nádorových lézí. Pro dosažení potřebného rozložení teploty se používají různé techniky, jako například fokusovaný ultrazvuk a radiofrekvenční, mikrovlnné nebo laserového ohřevu. V této práci se budeme zabývat technikou mikrovlnného ohřevu s frekvencí 2,45 GHz.

V bimodálních léčebných schématech, jako je termoradioterapie (RTHT) a chemoradioterapie (RTCT), stejně jako v trimodální termochemoradioterapii (RTHTCT),

se HT využívá k rozšíření nebo podpoření léčebných účinků samotných modalit [23].

Podle velikosti léčené oblasti se rozlišuje HT celotělová, regionální a lokální [26]. V této práci se budeme zabývat lokální HT realizovanou pomocí vhodného planárního aplikátoru. Hypertermický aplikátor je zařízení, které převádí elektromagnetickou energii z generátoru do léčené oblasti. Vhodný tvar aplikátoru závisí na morfologii a poloze nádoru [28].

Umístění nanočástic oxidu železa přímo do tkáně nádoru umožní větší selektivitu ohřevu a redukuje se tak riziko poškození okolní zdravé tkáně. Zvýšení teploty v dané oblasti má potom různé účinky na celý "ekosystém" nádoru, aniž by se zvýšenou teplotou zatížily okolní normální buňky. Jedním z nich je například stimulace imunitního systému, která bude dále rozebrána v kapitole Rešerše a již jsme experimentálně ověřili pomocí testu ELISA z cytokinů separovaných z krevního séra myši.

Cílem této práce je realizovat mikrovlnný aplikátor pro frekvenci 2,45 GHz, provést měření jím vytvořeného SAR ve fantomu svalové tkáně, provést mikrovlnnou expozici nádorů myši ošetřených nanočásticemi oxidu železa a zaznamenat časový průběh teploty v nádoru a nakonec vyhodnotit účinek expozice na obecnou a lokální imunitu myši.

## SHRnutí SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

---

V této kapitole vysvětlíme biologickou podstatu hypertermie, položíme technický a fyzikální základ mikrovlnné hypertermie, seznámíme se s funkcí nanočástic v nádoru.

### 2.1 BIOLOGIE NÁDORU

Mezi základní charakteristiky nádorové tkáně můžeme řadit následující výčet znaků.:

- soběstačnost v produkci růstových signálů (mnoho nádorových buněk má na rozdíl od normálních buněk schopnost produkovat signály, které vedou k zahájení proliferace)
- necitlivost na růstové supresory
- invaze do tkání a metastázy
- neomezený replikační potenciál
- trvalá angiogeneze (růst krevních cév)
- vyhýbání se apoptóze (řízená smrt buněk)[22]

Jedním z nejdůležitějších znaků nádorových buněk je pravděpodobně jejich schopnost udržet chronickou proliferaci. Zdravé tkáně řídí produkci a uvolňování signálů podporujících růst (proliferační signály). Tyto signály u zdravých buněk regulují průběh buněčného cyklu stejně jako růst buněk a dělení buněk, čímž se zajistí homeostáza počtu buněk a tím udržení normální tkáňové architektury a funkce. Proliferačními signály mohou být ovlivněny ještě další vlastnosti, jako je přežití buněk a energetický metabolismus. Rakovinné buňky však tomuto schématu neodpovídají. Rezistencí vůči signálům sloužícím ke kontrole proliferace si vytváří svůj vlastní program reprodukce [11].



Biologii nádorů však nelze rozumět jednoduše výčtem znaků rakovinných buněk, ale musí zahrnovat příspěvky celého mikroprostředí nádoru k nádorovému onemocnění. Nádorové mikroprostředí totiž zahrnuje kromě transformovaných nádorových buněk také mnoho dalších typů buněk, biologických struktur a systémů, které jsou navzájem propojené a vytváří složitou komunikační síť. Jsou to například efektorové buňky imunitního systému, cytokiny, krevní destičky, vaskulární a lymfatický systém, hormony, nervová zakončení, a též stroma obklopující nádor [11, 25].

Vznik nádorového onemocnění je komplexní několikastupňový proces. Nádorová onemocnění vznikají zejména mutacemi genů zodpovídajícími za buněčnou proliferaci. Tyto genetické změny pak umožňují růst buněk nezávisle na regulačních mechanismech. Pro vznik maligního klonu buněk jsou zásadní primární genetické změny, které však k rozvoji nádorového onemocnění samy o sobě ještě nestačí. Pro růst a další progresi nádoru musí dojít k adaptaci buněk na nádorové mikroprostředí. Například záněty, genová nestabilita a mutace tedy nemusí nutně způsobovat rakovinu, ale napomáhají buňkám přejít z normální na onkogenní [11]. Na kontrole růstu nádorových buněk se zejména v počátečních stádiích vzniku nádorového onemocnění významně podílí imunitní systém, do něhož jsou zapojeny buňky specifické i nespecifické imunity. S rozvojem nádoru jsou však imunitní mechanismy potlačovány případně dokonce využívány ve prospěch nádoru [22].

### 2.1.1 Mikroprostředí nádoru

Rozdíly v pH a morfologii vaskulatury jsou nejrelevantnějšími charakteristikami pro aplikaci nanočástic, proto je zde popíšeme.

Zatímco intracelulární pH buněk v zdravých tkáních a nádorech je podobné, nádory vykazují nižší extracelulární pH než normální tkáň. Ačkoliv se pH nádoru může měnit v závislosti na oblasti nádoru, průměrná hodnota extracelulárního nádoru je mezi 6,0 a 7,0, zatímco v normálních tkáních a krvi je extracelulární pH přibližně 7,4.

Angiogeneze je definována jako vytvoření nových krevních cév z původních. U solidních nádorů ( $1\text{ mm}^3$  až  $2\text{ mm}^3$ ) se mohou kyslík a živiny dostat ke středu nádoru jednoduchou difúzí. Nádory bez funkčních cév jsou vysoce závislé na svém mikroprostředí kvůli zásobování kyslíkem a živinami. Když nádory dosáh-

nou  $2 \text{ mm}^3$ , začíná stav buněčné hypoxie, což iniciuje angiogenezi. Angiogeneze je regulována jemnou rovnováhou aktivátorů a inhibitorů.

Hypoxie zvyšuje transkripci HIF (hypoxia inducible factor) vedoucí k up regulaci angiogenetických proteinů jako například VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) nebo  $\text{TNF-}\alpha$ .

Konkrétněji jsou nádorové cévy obecně charakterizovány abnormalitami, jako je vysoký podíl proliferujících endotelových buněk, nedostatek pericytů a tvorba aberantních bazálních membrán vedoucí ke zvýšené vaskulární permeabilitě.

Nanočástice o velikosti 20 nm až 200 nm se mohou extravazovat a hromadit uvnitř intersticiálního prostoru. Endoteliální póry mají rozměry od 10 do 1000 nm. Kromě toho v nádoru chybí lymfatické cévy nebo nejsou funkční, což přispívá k snížení účinnosti odplavení z nádorové tkáně. Nanočástice vstupující do nádoru nejsou účinně odstraněny, a tak zůstávají v nádoru. Tento pasivní jev se nazývá "Enhanced Permeability and Retention (EPR)" a objevili ho Matsumura a Maeda [8].

### 2.1.2 *Protinádorová imunitní reakce*

Reakce imunitního systému proti nádoru spočívá v rozpoznání buněk nádoru a jejich účinném zničení [15].

#### 2.1.2.1 *Antigeny asociované s nádory*

Nádory pocházejí z vlastních buněk organismu. Proto je imunitní systém může do určité míry tolerovat. Avšak během karcinogeneze dochází ke genetickým změnám, a tak se exprimují proteiny (antigeny) buď pozměněné nebo v jiném množství, což je činí rozpoznatelnými pro imunitní systém. Existují dva typy antigenů asociovaných s nádory. První typ je rozpoznatelný pro protilátky (proteiny syntetizované a vylučované B-lymfocyty). Rozpoznávanými antigeny bývají obvykle membránové proteiny. Druhý typ antigenů je rozpoznatelný pro T-lymfocyty [15, 18].

#### 2.1.2.2 *Buňky prezentující antigen*

Protinádorovou imunitní reakci mohou iniciovat buňky prezentující antigen, což jsou specializované pomocné buňky imunity. Patří mezi ně dendritické buňky,

B-lymfocyty a makrofágy. Dendritické buňky jsou rovnoměrně rozptýleny v tkáních, v nichž pohlcují antigeny. Pokud jsou aktivovány, přemístí se do lymfatických uzlin, kde aktivují T-lymfocyty s vhodným receptorem. V mikroprostředí nádoru jsou buňky prezentující antigen zastoupeny dendritickými buňkami a makrofágy. Makrofágy v nádoru však často způsobují inhibici prezentace antigenů produkcí interleukinu 10. Dalším faktorem narušujícím imunitní reakci proti nádoru je inhibice dendritických buněk v nádoru vlivem cytokinů přítomných v nádoru (kromě interleukinu 10 je to např. PGE<sub>2</sub> a TGF-β. Prezentace antigenů nádorovými buňkami může být znesnadněna kvůli nedostatku antigenů v buňkách nádoru nebo kvůli tomu, že buňky nádoru jsou pouze slabě antigenní [15, 18].

### 2.1.2.3 Aktivace a význam T-lymfocytů v protinádorové aktivitě

K aktivaci vyztřálých a vyselektovaných T-lymfocytů v thymu může dojít, pokud se T-buněčný receptor (na povrchu T-lymfocytu) dostane do kontaktu s buňkou prezentující antigen, na níž se nachází komplex antigen-MHC (hlavní histokompatibilní komplex) molekula. Dále je k aktivaci potřeba přítomnost tzv. kostimulačního signálu. Tímto signálem je obvykle navázání povrchové molekuly CD28 T-lymfocytů na CD80 či CD86 antigen-prezentujících buněk[18]. T-lymfocyty CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> mohou být po aktivaci deletovány apoptózou. Tento mechanismus, který slouží k regulaci nadměrné imunitní reakce, může být příčinou selhání protinádorové imunitní reakce. Existují dva typy T-lymfocytů, které mají význam pro protinádorovou imunitní reakci [15, 18]:

- Th lymfocyty (CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty) - Jejich hlavní význam spočívá v poskytnutí kostimulačních signálů pro navázané naivní<sup>1</sup> cytotoxické T-lymfocyty a v aktivaci antigenu prezentující buňky [15].
- Cytotoxické T-lymfocyty - Tyto buňky patří mezi jednu z nejvýznamnějších buněčných populací účastnících se v protinádorové imunitní reakci. Zahrnují dva typy buněk:
  - CTL-lymfocyty (cytotoxické; CD8<sup>+</sup>) – Jejich význam spočívá v rozpoznávání antigenů nádorových buněk, navázání na tento antigen a následné zničení nádorové buňky indukci apoptózy.

<sup>1</sup> T-lymfocyty, které se ještě neseťkaly s příslušným antigenem, nebyly dosud aktivovány



- NK-buňky ("natural killers") – Patří mezi buňky nespecifické (vrozené) imunity. Mají největší podíl na cytotoxické protinádorové aktivitě. Podobně jako CTL-lymfocyty dokáží nádorové buňce způsobit apoptózu.

## 2.2 BIOLOGICKÉ ÚČINKY HYPERTERMIE

Biologický princip hypertermie je založen na menší odolnosti nádorové tkáně vůči tepelné zátěži oproti zdravé tkáni. U nádorové tkáně s průměrem větším než asi 2 cm přestává fungovat obranný mechanismus proti zvyšování teploty již při teplotě nad 41 °C. Tento mechanismus spočívá ve zvýšení průtoku krve zasaženou oblastí. V nádoru jsou však přítomny novotvořené defektní kapiláry, které nejsou schopny reagovat na zvýšení teploty. U nádorové tkáně je navíc zvýšen účinek ohřevu vlivem nedostatku kyslíku a výživných látek v nádoru[37].

Problematika biologických účinků hypertermie je však velmi komplikovaná především z důvodu obtížné realizace experimentů v této oblasti. Mnoho prací zabývajících se touto tematikou má proto spekulativní charakter a výsledky některých studií jsou protichůdné[37].

V literatuře se můžeme setkat s rozdělením na tepelné a netepelné účinky elektromagnetického pole[37].

### 2.2.1 Tepelné účinky

Při zvýšené absorpci energie jsou obvykle pozorovány tzv. tepelné účinky mikrovlnného záření [1]. Těch je využíváno při termoterapii [37]. Hlavním parametrem určujícím tepelné účinky je SAR (specifická míra absorpce) [1].

Mikrovlnný ohřev využívá schopnost některých sloučenin (kapalin nebo pevných látek) přeměňovat elektromagnetickou energii na teplo. Přenos energie je způsoben dielektrickými ztrátami, na rozdíl od vodivých procesů pozorovaných při konvenčním ohřevu. Míra ohřevu závisí na dielektrických vlastnostech molekul, což je také v kontrastu konvenčním ohřevem. Tyto charakteristiky znamenají, že absorpce záření a ohřev může být prováděn selektivně. Mikrovlnné ozařování je rychlé a objemové, při němž se ohřívá celý materiál současně. Naproti tomu konvenční zahřívání je pomalé a postupné směrem od povrchu vzorku [9].

Vedle tepelných účinků lze v biologických systémech pozorovat též účinky samotného elektromagnetického pole. Oddělit od sebe efekt tepelných a netepelných účinků je velmi obtížné [37]. Z tohoto důvodu se v současné době často pojem tepelné a netepelné účinky nahrazuje pojmem "účinky na vysoké resp. nízké úrovni elektromagnetického pole" [24].

### 2.2.2 Netepelné účinky

Netepelnými účinky se rozumí přímé účinky elektromagnetické energie. Tyto účinky jsou pozorovány i při velmi nízké energetické úrovni, při níž nedochází k tepelným účinkům [37]. Účinek ozařování mikrovlnami na chemické reakce probíhající v živých systémech je velmi složitý. Vliv magnetického pole nebyl zatím přesvědčivě objasněn. Otázka netepelných účinků je stále kontroverzní záležitostí [9]. Velizarov např. naznačuje, že expozice elektromagnetického pole způsobuje přechodné účinky a dlouhá doba expozice (hodiny, dny) může vést k určitému přizpůsobení, takže malé změny nemusí být detekovány. To může být jedním z problémů výzkumu [33]. Podle další studie mikrovlnné záření vyvolalo změny v konformaci chromatinu. Tyto změny byly podobné změnám indukovaným tepelným šokem. S největší pravděpodobností budou mechanismy netepelných účinků založeny na kvantově-mechanickém přístupu a fyzice nerovnovážných a nelineárních systémů. Tyto účinky však závisí na několika fyzikálních a biologických proměnných [1]. Závěrem tedy lze konstatovat, že probíhající studie neprokázaly škodlivé účinky na DNA, buněčné membrány ani enzymy [24].

### 2.2.3 Změny perfuze a okysličování

Bylo prokázáno, že mírná HT může zvýšit krevní perfuzi ohřívané tkáně, obzvláště v první fázi ohřevu tumoru. Zlepšení mikrocirkulace by pak mohlo vést ke zvýšení dodávky kyslíku. Podle některých studií k tomuto jevu přispívá přímo tepelně závislé usmrcování buněk a ztráta mitochondriálního membránového potenciálu. Naopak jiné studie prokázaly zvýšenou spotřebu kyslíku při zvýšené teplotě tkáně (van't Hoffův zákon). To by působilo proti okysličujícímu účinku zvýšené perfuze. Některé studie uvádějí zvýšení perfuze, které trvá 24 hodin po HT, což

by prospělo při následujících RT/CT ošetřeních. Jiné studie však nemohly tento výsledek potvrdit.

I když interpretace změn perfúze a okysličování v důsledku HT jsou stále kontroverzní, vzhledem k tomu, že hypoxie je hlavním příčinným faktorem pro radiorezistenci, snížení hypoxie prostřednictvím HT může být odpovědné za pozorovanou radiosenzitizaci [23].

#### 2.2.4 *Indukce buněčné smrti*

Apoptóza, někdy nazývaná buněčná sebevražda, je geneticky regulovaná a je klíčová k obraně a potlačení rakoviny [7].

Bylo prokázáno, že hypertermie způsobuje buněčnou smrt apoptózou nebo mitotickou katastrofou. Hypertermie totiž vyvolává rozvinutí obzvláště tepelně labilních nehistonových jaderných proteinů, což vede k agregaci s okolními bílkoviny a následnému spojení s jadernou matrix. V důsledku toho jsou narušeny základní funkce závislé na jaderné matrix, jako je transkripce, replikace nebo opravy DNA. Porucha replikace DNA nakonec způsobuje chromozomové aberace, nestabilitu genomu a buněčnou smrt mitotickou katastrofou.

Apoptóza může být zprostředkována aktivací membránového receptoru buněčné smrti a následnou aktivací kaspázy 3. Rozsah apoptózy se liší mezi různými typy nádorů. Navíc se mění permeabilita buněčných a mitochondriálních membrán, což vede k prudkému vzrůstu  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce, stejně jako k mitochondriální depolarizaci což vede k výbuchům (bursts) reaktivních forem kyslíku. Oba mechanismy mohou dále zvyšovat nestabilitu proteinů a apoptózu [23].

#### 2.2.5 *Inhibice oprav DNA*

Existují dostatečné důkazy prokazující inhibici mechanismů oprav DNA při HT. Již při klinicky dosažitelných mírných teplotách 41 °C až 42,5 °C spojených s degradací genu BRCA2 dochází k inhibici homologní rekombinace. Dále hypertermie zhoršuje funkci proteinového komplexu Ku, který se uplatňuje při opravách DNA. Při dodávání tepla jsou též sníženy opravy DNA pomocí vystřížení báze.

Hypertermie funguje na více úrovních zahrnujících opravy vystřížením, spojování nehomologních konců a homologní rekombinaci ovlivňující opravy lézí DNA

stejně jako opravy jednořetězcových a dvouřetězcových zlomů DNA. V důsledku toho jsou zlepšeny účinky léčby poškozující DNA, jako je chemoterapie nebo adio-  
terapie [23].

#### 2.2.6 *Stimulace imunity*

Zvýšením tělesné teploty se aktivují různé složky imunitního systému (např. se zvýší motilita neutrofilů a monocytů, zesílí se fagocytóza, zvýší se produkce protilátek, indukují se proteiny tepelného šoku HSP).

Výsledky studií zabývajících se vlivem hypertermie na antigenicitu nádorových buněk jsou kontroverzní. Stále se diskutuje, zda hypertermie způsobuje rezistenci nádorových buněk vůči imunitnímu systému nebo ho naopak aktivuje.

Bylo zjištěno, že termální stres může aktivovat dendritické buňky. Ty pak jsou schopny lépe iniciovat a regulovat imunitní reakci.

Monocyty a makrofágy jsou antigen prezentující buňky. Podle studie [31] může hypertermie zvyšovat vychytávání antigenů těmito buňkami.

Proteiny tepelného šoku HSP jsou stresovými proteiny, které jsou v buňkách exprimovány při různých stresových stimulech včetně tepelných stimulů [15]. HSP stimulují aktivitu NK buněk a antigen prezentujících dendritických buněk. Prezentace těchto nádorových antigenů může způsobit specifické protinádorové imunitní odpovědi uskutečňované buňkami CD8<sup>+</sup>[23]. Podle hypotézy [17] se HSP uvolněné z buňky po jejím odumření navazují na antigeny nádorových buněk. Tyto komplexy se následně váží na dendritické buňky nebo jiné antigen prezentující buňky, které potom stimulují naivní T-lymfocyty, čímž je aktivována protinádorová imunitní reakce [15].

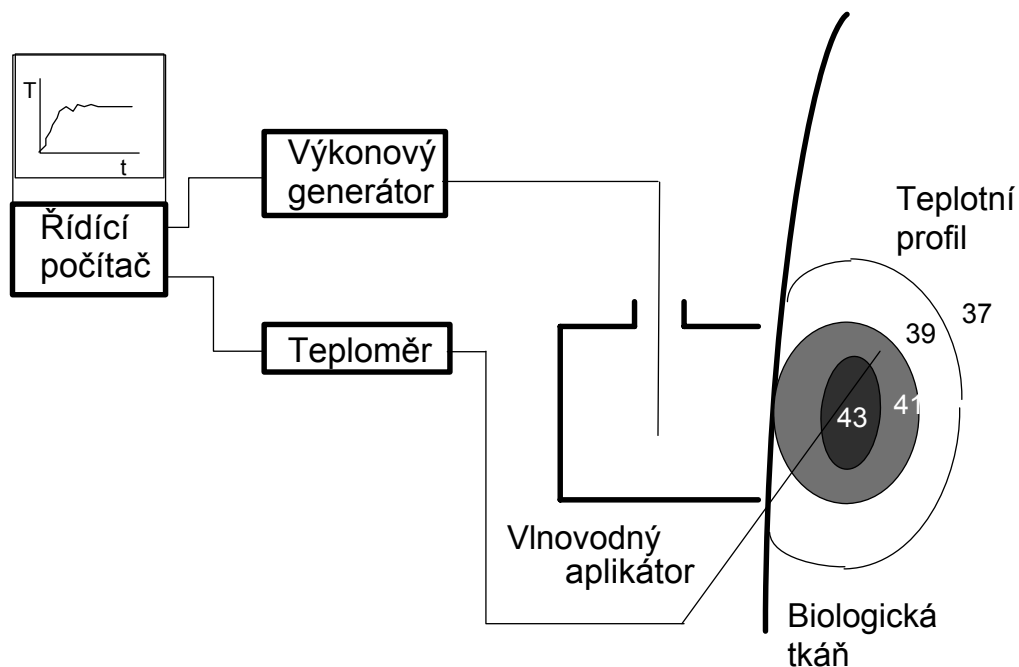
Hypertermie tedy pravděpodobně vyvolává vedle přímých účinků na metabolismus buněk i různé druhy imunitní odpovědi na místní a systémové úrovni. Konkrétně se jedná například o zvyšování exprese imunogenních povrchových receptorů zesilujících účinnost a funkci NK (natural killer) buněk a buněk CD8<sup>+</sup> (cytoxických T lymfocytů)[23].

Přímé zvýšení imunogenní aktivity leukocytů je zprostředkováno zvýšenou lyzační aktivitou NK buněk, aktivací makrofágů, dozráváním dendritických buněk a zvýšenou produkcí cytokinu interferon gamma, stejně jako cytotoxicitou buněk CD8<sup>+</sup>. Navíc je při hypertermii zesílena migrace buněk zvýšenou perfuzí [23].



## 2.3 TECHNICKÁ HLEDISKA HYPERTERMIE

V této kapitole se budeme zabývat technickým vybavením, které je potřeba pro mikrovlnnou hypertermii, s důrazem na aplikátory a termometrická zařízení.



Obrázek 2.1: Schéma uspořádání termoterapeutické soupravy [36]

Obrázek 2.1 ukazuje blokové schéma technického vybavení pro termoterapeutickou léčbu. Toto schéma je rozvrženo pro aplikaci lokální termoterapie.

Výkon generátoru může regulovat počítač, jehož úkolem je zajistit požadovaný časový průběh teploty. Teplota ve sledované oblasti může být snímána například termočláňkovými, termistorovými nebo optickými čidly. Tato čidla jsou napojena na centrální teploměr, od kterého získává data řídicí počítač [36].

### 2.3.1 Hypertermické aplikátory

Aplikátor je jedním ze základních prvků všech hypertermických zařízení. Závisí na něm účinnost přenosu energie z generátoru do biologické tkáně a rozhoduje o rozměrech a tvaru ohřívané oblasti [16].

Existuje několik typů hypertermických aplikátorů. Z hlediska použití pro různé typy a umístění nádorů, je možno rozdělit aplikátory do následujících skupin.:

- Aplikátory pro intrakavitární termoterapii: Mají válcový tvar anebo méně často velmi plochý tvar.
  - Koaxiální intrakavitární aplikátory - v literatuře patří mezi nejčastěji diskutované intrakavitární aplikátory z důvodu jejich vhodného tvaru a jednoduchého a tedy i relativně levného postupu výroby, bývají realizovány ve tvaru monopólů nebo dipólů [37].
  - Planární intrakavitární aplikátory - lze je vyrobit z ohebného materiálu, což umožňuje úplný kontakt aplikátoru s biologickou tkání. Planární intrakavitární aplikátory jsou zpravidla odvozeny od mikropáskových vedení a rezonátorů [37].
  - Šroubovicové intrakavitární aplikátory - lze je výhodně modifikovat tak, aby se energie vyzařovala "čelem" aplikátoru [37].
- Lokální aplikátory: Jsou určeny pro léčbu nádorů uložených v blízkosti povrchu těla, ale též hloubkovou termoterapii [15]. Existují 2 základní typy: vlnovodný aplikátor, který je tvořen úsekem propustného vlnovodu, tzn. buzeného nad mezním kmitočtem a dále planární aplikátor
- Regionální (celotělové) aplikátory - Jsou určeny pro ohřev rozsáhlejší oblasti lidského těla. Vytváří sbíhavou válcovou vlnu nebo její část. Tato vlna se pak šíří z povrchu těla směrem dovnitř [36].
- Intersticiální aplikátory - představují systém miniaturních sond zpravidla ve formě jehel, které se dočasně voperují do nádoru. Teplo je v tomto případě generováno vysokofrekvenčním proudem, který protéká mezi jednotlivými sondami [37].

V naší práci se budeme zabývat aplikátory pro lokální termoterapii, pro které existuje z technického hlediska rozdělení na aplikátory vlnovodové a planární.

#### 2.3.1.1 Vlnovodné aplikátory

Nejčastěji se pro klinické aplikace používají vlnovodné aplikátory vyzařující rovinnou vlnu. Dochází u nich k menší ztrátě přenášené elektromagnetické energie než u aplikátorů, které vyzařují kulovou nebo válcovou vlnu [34]. Vlnovodná technika je výhodná z hlediska možnosti přenosu největšího výkonu, velmi širokého

pásma možných přenášených frekvencí a úplně potlačeného vyzařování přenášené energie do okolního prostoru. Nevýhodou vlnovodu jsou mnohem větší náklady na výrobu oproti mikrovlnné integrované technologii (např. mikropáskovému vedení). Vlnovodná technika má proto dobrý potenciál využití pro velmi náročné aplikace, kde cena není rozhodujícím parametrem [36].

Vlnovod je kovová trubice, která má nejčastěji obdélníkový nebo kruhový průřez [36]. Z vlnovodného aplikátoru se elektromagnetická vlna šíří coby hloubková vlna od místa vniku do hlouběji uložené tkáně [15]. Ve vlnovodu se formuje elektromagnetické pole do tzv. vidů podle rozměrů kovového pláště. Na formě vidů závisí tvar teplotního profilu v biologické tkáni. Každý vid má svou mezní frekvenci. Pokud chceme ve vlnovodu budít určitý vid, je třeba zvolit frekvenci vyšší než mezní, aby se energie vlnovodem přenášela. Pokud bychom zvolili frekvenci nižší než mezní, přenášená energie by se exponenciálně tlumila podél vlnovodu a jednalo by se o tzv. evanescentní vidy [14]. V současné době se již pro běžnou praxi využívá i těchto vlnovodů buzených pod mezním kmitočtem [37].

Elektromagnetická energie se vlnovodem může šířit formou vlny TE nebo TM. Elektrické pole TE (transverzálně elektrické vlny) má jen příčné složky, magnetické pole má i složku podélnou vůči směru šíření. Magnetické pole TM (transverzálně magnetické vlny) má jen příčné složky, zatímco pole elektrické má i složku podélnou vůči směru šíření). Vlna TEM (transverzálně elektromagnetická) má složky elektrického i magnetického pole kolmé na směr šíření, podélná složka zde není. Přenosovou strukturu v tomto případě neoznačujeme jako vlnovod, (jako v předchozích dvou), ale jako mikrovlnné vedení [35].

Pro jednovidový přenos energie se používá kmitočtu řádově v pásmu od stovek MHz až do stovek GHz. Horní hranice tohoto rozmezí zajistí, že rozměry vlnovodu nebudou příliš malé, což by znesnadňovalo výrobu.<sup>2</sup> Dolní hranice zase zajistí, aby aplikátor neměl rozměry příliš velké rozměry a hmotnost, což by zase znesnadňovalo manipulaci při aplikaci [36].

### 2.3.1.2 Planární aplikátory

Planární (páskové) aplikátory se využívají pro některé speciální aplikace, kde jsou požadovány malé rozměry aplikátoru, jako například léčba kožních nádorů na hlavě pacienta, nádory v ústní dutině apod. [patent] Planární aplikátory jsou tvo-

<sup>2</sup> Pro kmitočtová pásma vyšší než 100 GHz lze využít vlnovodů, které přenášejí více vidů (tzv. nadrozměrné vlnovody).

řeny páskovým vedením, které je stejně jako obecné mikrovlnné vedení schopno přenášet vlnu TEM. Pásková vedení se obvykle realizují na dielektrických substrátech na bázi korundu nebo teflonu. Výhodou oproti vlnovodné a koaxiální technologii jsou výrazně nižší výrobní náklady, menší rozměry a nižší hmotnost a příkon. Jejich nevýhodou oproti vlnovodné a koaxiální technice je podstatně nižší měrný útlum a také o několik řádů nižší maximální přenositelný výkon [35].

- Mikropáskové vedení – Mikropáskové vedení je tvořeno tenkou destičkou (0,2 mm až 1 mm) z nízkoztrátového dielektrika. Spodní plocha této destičky je celá pokovená. Na vrchní straně jsou vytvořeny tenké kovové pásy [35].
- Symetrické páskové vedení – Symetrické páskové vedení je tvořeno tenkou dielektrickou destičkou, která je pokovena z obou stran. Uvnitř dielektrika je velmi tenký střední vodič [35].
- Koplanární vedení – Vodiče koplanárního vedení leží na jedné straně dielektrické destičky. Výhodou je snadná výroba, nevýhodou je vedení vlny TE s nulovou mezní frekvencí při vyšších frekvencích [35].
- Štěrbinové vedení – Štěrbinové vedení je svou geometrií velmi podobné koplanárním vedením. Vodiče leží také na jedné straně dielektrické destičky. Mezi nimi je štěrbinová, jejíž šířka je mnohem menší než šířka vodičů [35].

### 2.3.2 Termometrická zařízení

Měření teploty v biologických tkáních je v současné době nejvýznamnějším úskalím hypertermie. Komplikace způsobují zejména nehomogenita biologické tkáně, u které dochází k nerovnoměrnému ohřevu, a proměnlivost průtoku krve danou oblastí, v jejímž důsledku se daný region ochlazuje různě rychle. Běžně dostupnými termometrickými přístroji je však možno měřit teplotu jen v několika bodech v prostoru. Informace o dosažené teplotě je tedy omezená a zatížená řadou problémů, které budou nastíněny dále v textu. Měření kovovými teplotními čidly s sebou přináší ještě další komplikace, které budou rozebrány v kapitole Diskuze. V současné době se využívá neinvazivní měření teploty pomocí nukleární magnetické rezonance nebo mikrovlnného radiometru, které umožňují získat informaci o třídimenzionálním rozložení teploty s vysokým rozlišením [15].

### 2.3.2.1 *Termočlánek*

Princip termočlánu je založen na Seebeckově efektu. Pokud máme dva vodiče z různých materiálů, které jsou na jednom konci galvanicky spojené a na druhém rozpojené, na rozpojeném konci bude naměřeno napětí (Seebeckovo napětí), jež je funkcí absolutní teploty  $T$  spoje.

$$e_A B = \alpha T \quad (2.1)$$

kde  $\alpha$  je Seebeckův koeficient a je obecně funkcí teploty.

Měřením Seebeckova napětí tedy lze v principu určit teplotu v daném místě [37].

### 2.3.2.2 *Termistor*

Termistor je polovodičový odporový senzor, který využívá závislosti odporu na teplotě [15]. Tato závislost bývá aproximována Steinhart-Hartovou rovnicí

$$\frac{1}{T} = A + B \ln R + C(\ln R)^3 \quad (2.2)$$

kde  $T$  je termodynamická teplota,  $R$  je odpor termistoru a  $A$ ,  $B$  a  $C$  jsou konstanty pro optimalizaci aproximace, které lze určit změřením závislosti ve třech bodech. Tímto způsobem lze dosáhnout přesnosti asi  $0,2^\circ\text{C}$  pokud je měřený rozsah teplot do  $100^\circ\text{C}$ .

Termistor je velmi citlivý prvek pro měření teploty. Protože vlastnosti termistorů jsou specifické pro každý konkrétní snímač, je nutná jejich pečlivá a pravidelná kalibrace.

Jedním z problémů při měření větších teplotních rozdílů pomocí termistoru je nelinearita závislosti teploty na odporu, což ale v lékařských aplikacích, kde je relativně malý rozsah teplot, není podstatné [37].

### 2.3.2.3 *Optický senzor*

Optický senzor je tvořen optickým vláknem, do kterého je vysílán optický signál o definovaném výkonu z LED nebo polovodičového laseru. Na výstupu je fotodetektor, který přijímá senzorem modulovaný optický signál. Senzor moduluje optický signál na základě teplotně závislé změny indexu lomu či absorpčních vlastností. Pomocí optického senzoru je možno určit teplotu v intervalu  $-50^\circ\text{C}$  až  $300^\circ\text{C}$

s rozlišením až  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Velkou předností optických senzorů teploty je, že neobsahují kovové součásti [15].

## 2.4 MAGNETICKÉ VLASTNOSTI MATERIÁLŮ

Magnetický stav materiálu je dán magnetickým momentem jeho atomů. Poměr vektorového součtu magnetických momentů všech a tomu materiálu ku objemu materiálu se nazývá magnetizace. Ta popisuje magnetický projev materiálu. Magnetický moment je vektorová fyzikální veličina určená následujícími faktory: pohybem elektronů po orbitách kolem atomového jádra, spinem elektronů (vnitřní magnetický moment) a vnějším magnetickým polem které ovlivňuje pohyb elektronů. Velikost magnetického momentu jádra je v poměru k magnetickému momentu elektronů asi 1:2000. Na celkové magnetické chování atomu tedy nemá vliv [30].

### 2.4.1 Domény

Domény jsou spontánně zmagnetované oblasti [13]. Skupiny magnetických momentů jsou uvnitř domény orientovány stejným směrem a kooperují spolu. Směr orientace určuje magnetická anisotropie [30]. Domény jsou odděleny energetickými bariérami, tzv. doménovými stěnami, s určitou charakteristickou šířkou a energií potřebnou k jejich vytvoření a existenci. Se zmenšujícími se rozměry částic ubývá počet domén. Od určitého kritického rozměru již není vytváření domén z energetického hlediska možné. Takové částice jsou jednodoménové [13, 30].

Magnetické momenty všech atomů jednodoménových částic míří jedním (snadným) směrem určeným magnetickou anisotropií [30]. Z toho důvodu Jednodoménová částice vykazuje velmi vysoký magnetický moment [13].

### 2.4.2 Interakce mezi magnetickými momenty v látce

V magnetických látkách dochází k interakcím mezi magnetickými momenty atomů a mezi magnetickými momenty s elektrickým potenciálem jejich okolí. Magnetické interakce podporují uspořádání magnetických momentů, zatímco teplotní fluktuace způsobují jejich neuspořádanost. Nad tzv. kritickou teplotou převažuje



jí teplotní fluktace a materiál vykazuje paramagnetické vlastnosti. Pod kritickou teplotou převažuje síla magnetických interakcí a magnetické momenty v látce jsou uspořádané [30].

Interakce magnetických momentů s elektrickým potenciálem jejich okolí vytváří magnetickou anisotropii (magnetické vlastnosti jsou závislé na směru působení vnějšího magnetického pole). Magnetická anisotropie pak určuje magneticky významné osy (snadné a těžké osy magnetizace) v materiálu. Anisotropní magnetické chování vykazují magneticky uspořádané látky [30].

Anisotropie uděluje krystalu magnetickou energii. Aby byla splněna podmínka minima celkové magnetické energie, která platí pro rovnovážný magnetický stav, je energeticky výhodné rozdělení krystalu na tzv. domény (oblasti se vzájemně odlišným směrem spontánní magnetizace). Změna směru magnetizace na rozhraní dvou domén není skoková, ale spojitá. Néelova nebo Blochova stěna je přechodová oblast mezi dvěma spontánně zmagnetovanými oblastmi (doménami). Vektor magnetizace se v této oblasti spojitě mění (přetáčí) z jednoho snadného směru v jedné doméně do jiného snadného směru v druhé doméně. Energie spotřebovaná vznikem doménové stěny snižuje celkovou magnetickou energii. Je mnohem snadnější magnetovat uspořádaný materiál podél snadné osy než podél těžké osy - rozlišujeme snadné a těžké osy magnetizace [30].

### 2.4.3 Dělení magnetických materiálů

Magnetická susceptibilita  $\chi_m$  je definována jako poměr magnetizace  $M$  ku intenzitě vnějšího magnetického pole  $H$ .

$$\chi_m = \frac{M}{H} \quad (2.3)$$

Vnější magnetické pole indukuje magnetizaci v materiálu. Magnetické materiály dělíme do několika skupin dle magnetické susceptibility [30]:  $M = \chi_m H$

- Magneticky neuspořádané materiály
  - Diamagnetické látky, kde  $-1 < \chi_m < 0$
  - Paramagnetické látky, kde  $0 < \chi_m \ll 1$
- Magneticky uspořádané materiály, kde  $\chi_m \gg 1$

- feromagnetické
- antiferomagnetické
- ferimagnetické

[30]

#### 2.4.4 *Diamagnetismus*

Magnetická susceptibilita diamagnetických látek je  $\chi_d \approx 10^{-5}$ . Po vložení diamagnetického materiálu do vnějšího magnetického pole, se v materiálu začne indukovat magnetický moment orientovaný proti směru vnějšího magnetického pole. Takovýto materiál je tedy z magnetického pole vypuzován. diamagnetická susceptibilita je jediným příspěvkem k celkové susceptibilitě, pokud jsou u daného materiálu všechny elektrony umístěny v uzavřených elektronových slupkách. Další významnou charakteristikou diamagnetické susceptibility je její teplotní nezávislost. Mezi diamagnetické látky patří např.: všechny vzácné plyny a téměř všechny organické sloučeniny [30].

#### 2.4.5 *Paramagnetismus*

Vnitřní magnetické momenty atomů paramagnetických látek spolu magneticky neinteragují a jsou náhodně orientovány [26].

Magnetická susceptibilita paramagnetických látek  $\chi_p$  je malá, kladná a závislá na teplotě  $T$  podle Curieho zákona

$$\chi_p = \frac{C}{T} \quad (2.4)$$

kde  $C$  je Curieho konstanta. Hodnota  $\chi_p$  se pohybuje v rozmezí od  $10^{-3}$  do  $10^{-5}$ . Vnější magnetické pole způsobí pouze částečné uspořádání magnetických momentů (a tím i indukci magnetizace). Její míra závisí na intenzitě vnějšího magnetického pole. Magnetická energie vnějšího magnetického pole totiž vyrovnává magnetické momenty do směru vnějšího pole, zatímco teplotní efekty náhodných fluktuací způsobují neuspořádanost směrů magnetických momentů [30]. Příkladem paramagnetických látek jsou atomy Al, Li, Na, K, Ti,  $O_2$  [26].

### 2.4.6 Feromagnetismus

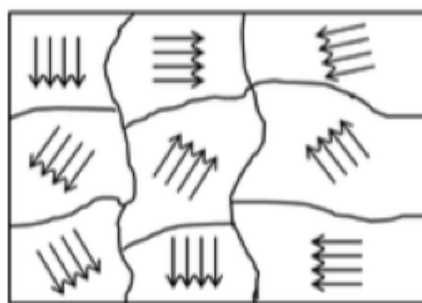
Elementární magnetické dipólové momenty jsou ve feromagnetických látkách uspořádány do domén [30].

Feromagnetické materiály vykazují velmi silné vzájemné interakce mezi atomovými momenty, z čehož vyplývá paralelní uspořádání magnetických momentů uvnitř jedné domény. Každá z domén je zmagnetizována i bez vnějšího magnetického pole [26].

V jednotlivých doménách jsou však v demagnetovaném stavu směry magnetizací orientovány náhodně. Jejich vektorový součet je tedy roven nule a tudíž i celková magnetizace je nulová. Pokud materiál vystavíme vnějšímu magnetickému poli, dojde k jeho magnetizaci, což se projeví vysokou hodnotu magnetické susceptibility [30].

Typickými feromagnetickými látkami jsou železo, nikl, kobalt, gadolinium a jejich slitiny. Hodnoty magnetické susceptibility pro feromagnetity jsou v rozmezí od 1 do 105. Pro každý feromagnetický materiál existuje určitá teplota (tzv Curieho teplota), která odpovídá teplotě, při níž se mění skupenství [26].

Když je tato teplota překročena, tak zaniká doménová struktura a materiál ztrácí své feromagnetické vlastnosti a vykazuje paramagnetický charakter [30].



Ferromagnet

Obrázek 2.2: Schématická reprezentace doménové struktury ve feromagnetických materiálech [26]

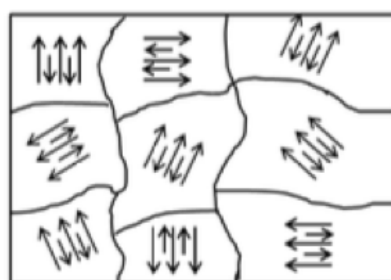
### 2.4.7 Antiferomagnetismus

Antiferomagnetické vlastnosti vykazuje materiál, v němž jsou magnetické momenty protisměrně vůči sobě a jejich velikost je totožná. Celková spontánní magnetiza-

ce je tedy nulová. Typickým příkladem jsou materiály složené ze dvou vzájemně se prolínajících magnetických podmřížek, přičemž magnetické momenty atomů v jedné podmřížce jsou orientovány opačným směrem než magnetické momenty v druhé podmřížce. Nad kritickou teplotou, tzv. Néelovou teplotou je materiál paramagnetický[30].

#### 2.4.8 Ferimagnetismus

U ferimagnetických látek jsou magnetické momenty uspořádány antiparalelně, ale na rozdíl od magnetických momentů v antiferomagnetických látkách nemají stejnou velikost. Celková magnetizace materiálu je proto nenulová. Ale protože obě magnetické podmřížky materiálu mají rozdílnou závislost magnetizace na teplotě, může se stát, že při určité teplotě (tzv. kompenzační teplota) bude velikost magnetických momentů obou podmřížek stejná a celková magnetizace materiálu tedy bude nulová. Nad Curieho teplotou je materiál paramagnetický, ale magnetická susceptibilita se zde neřídí Curieho zákonem[30].



Ferrimagnet

Obrázek 2.3: Schématická reprezentace doménové struktury ve ferimagnetických materiálech [26]

## 2.5 NANOMETRICKÝ MAGNETISMUS

Fenomén nanomagnetismu zahrnuje magnetické vlastnosti objektů, které mají alespoň jeden rozměr v nanoskopickém rozsahu (1 nm až 100 nm). Výskyt této samostatné oblasti výzkumu fyziky je způsoben skutečností, že nanoskopické materiály mají různé magnetické vlastnosti ve srovnání se stejnými materiály v makrosko-

pických rozměrech. Tento rozdíl vyplývá ze skutečnosti, že magnetické nanomateriály mají následující vlastnosti [26]:

- Rozměry srovnatelné s velikostí magnetických domén a délkou výměnných interakcí mezi magnetickými momenty atomů [26].
- Vyšší počet povrchových atomů [26]
- Silné interakce s okolím. Vlastnosti nanomateriálů jsou tedy obvykle odvozeny od souborů nanoobjektů [26].
- Obtížně reprodukovatelné vlastnosti, protože přítomnost nedokonalostí a defektů se stává důležitější [26].
- Krystalová symetrie na povrchu částice je rozpadlá – to vede ke zvýšení povrchové anisotropie [30]
- Jejich magnetické chování je ovlivněno silou mezičásticových interakcí a strukturou nanočástice [30]

Hlavní charakteristické veličiny, které definují vlastnosti magnetického pole jsou délka výměny a šířka doménové stěny [26].

### 2.5.1 *Superparamagnetismus*

Magnetizace je ve stabilním stavu díky anisotropní energii, jíž je určena energetická bariéra oddělující snadné směry magnetizace. Se zmenšujícími se rozměry částic se anisotropní energie snižuje a vyrovnává se s energií teplotních fluktuací. Pokud energie teplotních fluktuací překoná energii anisotropní, směr magnetizace se samovolně (bez přítomnosti magnetického pole) překlápí z jednoho snadného (energeticky výhodného) směru magnetizace do druhého [13, 30].

Toto teplotně aktivované magnetické chování se nazývá superparamagnetismus. Relaxační čas udává setrvání magnetického momentu v jednom snadném směru než se překlápí do jiného [13].

Superparamagnetismus je často pozorován u magnetických jednodoménových nanočástic. V materiálu větších rozměrů jsou magnetické momenty rozděleny do magnetických domén. Tímto způsobem systém minimalizuje celkovou magnetostatickou energii. U běžných feromagnetů je kritická velikost jedné magnetické

domény typicky  $10^{-8}$  m až  $10^{-9}$  m. Tato velikost definuje kritickou velikost jedné feromagnetické částice, která působí jako jediná magnetická oblast. Existují specifické parametry používané pro popis superparamagnetických vlastností nanomateriálů, jako je blokovací teplota, TB a magnetokrystalická anizotropie. V ideálním případě superparamagnetického systému neexistují vzájemné interakce mezi částicemi. Blokovací teplota TB může být charakterizována jako teplota „zmrazení“ magnetického momentu nanočástic (superspin). Při teplotách nad TB nelze ustanovit stabilní objemovou magnetizaci kvůli teplotním fluktuacím a systém vykazuje superparamagnetické chování podle Curieova zákona. Náhodné uspořádání každého magnetického momentu způsobuje redukci celkové magnetizace. Při teplotách pod TB se superspiny částíček mrazí v náhodnou orientaci (nemohou se volně otáčet, existuje energetická bariéra). Tepelná aktivace částic nemůže překonat anizotropní energii EA a magnetický moment každé částice se otáčí na nejbližší osy lehké magnetizace (získáváme nenulovou koercitivitu pole HC, podobně jako u feromagnetů) [6].

### 2.5.2 Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION)

Mají velký potenciál v biomedicínských aplikacích díky biokompatibilitě, biodegradabilitě a možnosti modifikovat jejich povrch, na který mohou být kovalentně navázány různé bílkoviny, protilátky, ligandy či receptory. SPION mohou být transportovány pomocí bílkovin (např. transferinem či ferritinem).

Kromě terapie nádorů lze SPION využít například pro zobrazování magnetickou rezonancí a cílenou distribuci léčiv.

Pro využití v biomedicínských aplikacích je požadována netoxičita, pH-stabilita ve fyziologickém prostředí a umístění do vodného roztoku [13].

### 2.5.3 Strukturní formy oxidů železa

Oxidy železa jsou složeny z iontů Fe a iontů  $O_2$ . Protože jsou anionty mnohem větší než kationty (poloměr  $O_2$  iontu je 0,14 nm, zatímco  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  jsou 0,065 a 0,082 nm), uspořádání aniontů řídí krystalovou strukturu [26].

Magnetit ( $Fe_3O_4$ ), též nazývaný magnetovec (oxid železnatoželezitý), je černý magnetický minerál patřící mezi významný oxid železa. Magnetitové nanočásti-



ce lze získávat z magnetotaktických bakterií, které je syntetizují. Výhoda takto získaných nanočástic je jejich vhodný tvar, biokompatibilita a obal z fosfolipidové membrány, která umožňuje vazbu bioaktivních látek [13].

Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) je další magnetický minerál, který má význam v bioaplikacích. Při pokojové teplotě vykazuje feromagnetické vlastnosti. Maghemit, má krystalovou strukturu podobnou magnetitu – (tedy struktura inverzního kubického spinelu), ale všechny nebo většina iontů železa jsou trojmocné. Při rozměrech menších než cca 25 nm začne být maghemit superparamagnetický. To se projevuje velmi silnou magnetickou odezvou po přiložení magnetického pole [13].

#### 2.5.4 Magnetické vlastnosti nanočástic oxidu železa

Pokud změníme rozměry z mikrometrických na nanometrické, dojde k dramatické změně magnetického chování. Magnetické částice menší než Dct SPM jsou SPM v pokojové teplotě. Kritické průměry stavu SPM pro nanočástice maghemitu nebyly teoreticky odhadnuty. Podle hlášených experimentálních výsledků jsou maghemitové nanočástice SPM o rozměrech menších než 10 nm při pokojové teplotě [26].

Magnetické nanočástice mají tendenci vytvářet agregáty v důsledku magnetických interakcí mezi částicemi. Výsledky studií vlivu interakcí mezi částicemi na magnetické vlastnosti systému nanočástic jsou v literatuře intenzivně diskutovány, protože bylo zjištěno, že silně ovlivňují magnetické chování nanočástic [26].

## 2.6 MECHANISMUS VZNIKU TEPLA

Při mikrovlnné hypertermii se využívá střídavého elektromagnetického pole o frekvencích 434, 915 a 2450 MHz, kdy se ohřívá především voda. K ohřevu vody (tkáně) dochází buď mechanismem ztrát vodivostních nebo dielektrických (posuvných), kdy se působením střídavého pole kmitající elektrické částice tkáně opozdí za budící složkou elektrického pole. Vodivostní ztráty převládají při působení elektrického pole o frekvencích nižších než 18 Hz a dielektrické ztráty při frekvencích nad 18 Hz. Hloubka vniku mikrovlnného záření do biologické tkáně klesá se zvyšující se frekvencí [15, 16].

K ohřevu multidoménných feromagnetik, antiferomagnetik a ferimagnetik dochází hysterezními ztrátami (jako důsledek opakovaných změn magnetické orientace).

### 2.6.1 Magnetická hysterese

Hlavním principem ohřevu nanočástic větších než 100 nm jsou hysterezní ztráty.

Hysterezní ztráty jsou hlavním mechanismem ohřívání u nanočástic 100 nm a větších [13].

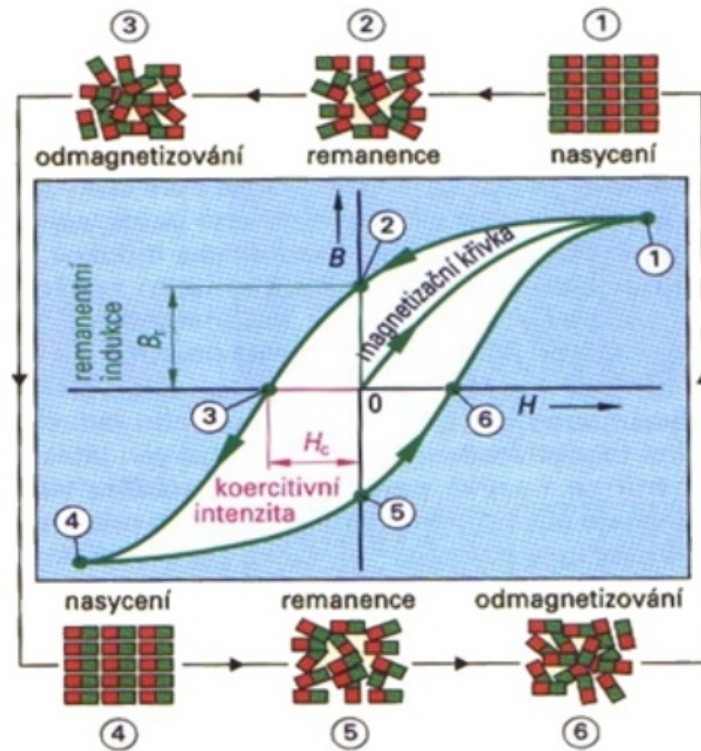
Hysterezní smyčka je funkce závislosti magnetické indukce  $B$  na intenzitě magnetického pole  $H$  ve feromagnetické látce, jak ukazuje [Obrázek 2.4](#).

Křivka prvotní magnetizace znázorňuje zmagnetování feromagnetického materiálu, který je vložen do magnetického pole poprvé. Materiál se bude magnetovat až do tzv. bodu nasycení (saturace; [Obrázek 2.4](#), (1)). To ve skutečnosti znamená, že se magnetické momenty uvnitř jednotlivých domén otáčejí ve směru pole. Domény se směrem shodným s polem začínají růst a domény odlišné od směru pole se zmenšují. Možná prodleva rotace magnetického momentu je spojena s přítomností lehké a těžké magnetické osy. Ve směru podél lehké magnetické osy dosáhne magnetizace krystalu nasycení v nižším magnetickém poli než ve směru podél tvrdé magnetické osy. Tento jev se nazývá magnetickou krystalickou anizotropií, která je charakterizována magnetickou energií potřebnou k otočení magnetizačního vektoru z lehké magnetické osy na těžkou magnetickou osu. Hodnota této energie je určena magnetickou anizotropní konstantou, která závisí na krystalové struktuře a chemickém složení magnetického materiálu [26].

Po zániku magnetického pole zůstane materiál částečně zmagnetovaný ([Obrázek 2.4](#), (2)). Remanentní magnetismus magneticky měkké látky by zanikl až po dlouhé době vlivem Brownova pohybu částic látky.

Pro rychlejší zánik remanentního magnetismu (jeho demagnetizaci; [Obrázek 2.4](#), (3)) je třeba na materiál působit opačným magnetickým polem. Intenzita tohoto pole se nazývá koercivní intenzita.

Pokud bude působení opačného magnetického pole pokračovat, materiál se opět zmagnetuje a magnetické póly budou opačné ([Obrázek 2.4](#), (4)).



Obrázek 2.4: Hysterézní smyčka [27]

Pro opětovnou demagnetizaci (Obrázek 2.4, (5)), odstranění remanentního magnetismu (Obrázek 2.4, (6)) a opětovné nasycení (Obrázek 2.4, (7)) je třeba změnit směr magnetického pole.

Plocha magnetické hysterézní smyčky je úměrná ztrátě energie v materiálu během jednoho cyklu změny pole (hysterézní ztráta). Tato energie způsobuje ohřev materiálu. V závislosti na tvaru hysterézní smyčky klasifikujeme magnetické materiály na magneticky měkké (úzká smyčka) a magneticky tvrdé (široká smyčka).

Tvar magnetizační křivky pro objemný magnetický materiál je určen účinnou magnetickou anizotropií, která zahrnuje krystalickou anizotropii (popsanou výše) a anizotropii vnitřních a vnějších faktorů demagnetizace. Anizotropie vnitřních faktorů demagnetizace je spojena se strukturální nehomogenitou magnetického materiálu. Anizotropie vnějších faktorů demagnetizace je spojena s nehomogenitou tvaru materiálu [26].

### 2.6.2 Néelova relaxace

V případě, že rotační pohyb vykonává pouze magnetický moment, zatímco samotná částice je v klidu, mluvíme o Néelově relaxaci. Tepelná energie je rozptýlena v krystalu při reorganizaci dipólových momentů jednotlivých atomů [13].

Teplo zde vzniká disipací energie při relaxaci magnetického momentu částice do své rovnovážné orientace (Néelova relaxace). Rovnovážné orientace definují magnetickou jednoduchou osu nanočástic. Vzhledem k magnetické anizotropii nanočástic má magnetický moment obvykle pouze dvě stabilní orientace, které jsou antiparalelní vůči sobě a oddělené energetickou bariérou. Pokud je materiál vystaven externímu střídavému magnetickému poli, magnetický moment se otočí, změní svůj směr. Tato rotace je bržděna energií

$$E = KV \quad (2.5)$$

jejíž disipací vzniká teplo.  $K$  je konstanta anizotropie a  $V$  je objem magnetického jádra. Průměrný čas mezi dvěma otočeními se nazývá Néelův relaxační čas a je definován pomocí Néelovy-Arrheniusovy rovnice (Rovnice 2.6), kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je absolutní teplota a  $\tau_0$  je materiálová konstanta, jejíž typické hodnoty jsou mezi  $10^{-9}$  a  $10^{-10}$  sekund. Tento mechanismus se uplatňuje u jednodomérových superparamagnetických nanočástic. Dalším mechanismem, kterým vzniká u superparamagnetických nanočástic teplo, je Brownův pohyb [12].

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (2.6)$$

### 2.6.3 Ohřev Brownovým pohybem

Také mechanismus Brownova pohybu způsobuje generaci tepla v důsledku viskózního tření mezi rotujícími částicemi a okolním prostředím, pokud se částice nachází uvnitř nosné kapaliny [12]. V důsledku viskozity nosné kapaliny a Brownova pohybu dojde k opoždění vektoru magnetizace za magnetickým polem. Tento efekt způsobí časovou proměnlivost momentu otáčení, a tedy rotaci částice v nosné kapalině. Změna orientace dipólového momentu tedy není způsobena reorientací magnetického momentu pouze v jádře, jako je tomu u Néelovy relaxace, ale rota-

cí celé částice nebo shluku částic [19]. K viskóznímu zpomalení rotačního pohybu dochází v závislosti na viskozitě kapaliny a hydrodynamickém objemu částice [16, 19, 21]. Tato závislost je vyjádřena následujícím vztahem,

$$\tau_B = \frac{3\eta V}{k_B T} \quad (2.7)$$

kde  $\tau_B$  je Brownův relaxační čas, je  $\eta$  viskozita okolní kapaliny,  $V$  je hydrodynamický objem částice,  $k_B$  je Boltzmannova konstanta a  $T$  je absolutní teplota [19].

Tento typ ztráty není omezen na superparamagnetické částice. Účinek viskózních ztrát byl jasně prokázán v experimentech s relativně velkými (asi 100 nm) drcenými magnetitovými částicemi suspendovanými ve vodném roztoku obsahujícím želatinu [12].

## 2.7 TEORETICKÝ ZÁKLAD PRO METODOLOGII

### 2.7.1 Definice SAR

SAR (specifická míra absorpce; jednotka  $\text{W kg}^{-1}$ ) je výkon absorbovaný jedním kilogramem tkáně. Touto veličinou je velmi přesně definována míra expozice biologické tkáně.

$$\text{SAR} = \frac{\partial}{\partial t} \left( \frac{\partial W}{\partial m} \right) = \frac{\partial}{\partial t} \left( \frac{1}{\rho} \frac{\partial W}{\partial V} \right) = \frac{\partial P}{\partial m} = \frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial V} \quad (2.8)$$

$W$  je elektromagnetická energie absorbovaná biologickou tkání,  $t$  je čas,  $m$  je hmotnost,  $P$  je výkon elektromagnetické vlny šířící se biologickou tkání  $\rho$  je hustota tkáně a  $V$  je její objem [36].

Pokud zaedbáme vedení tepla v modelu tkáně, můžeme SAR vyjádřit pomocí časové derivace časově závislého prostorového rozložení teploty ve studovaném modelu.

$$\text{SAR} = c \frac{\partial T(x, y, z, t)}{\partial t} = c \frac{\Delta T(x, y, z, t)}{\Delta t} \quad (2.9)$$

$T(x, y, z, t)$  je časově závislé prostorové rozložení teploty a  $c$  je měrné teplo modelu [36].

### 2.7.2 Kultivace buněk

Pro založení kultury se používají buňky vyizolované z laboratorních zvířat nebo od člověka. My jsme použili buňky myšního (kmen BALB/c) kolorektálního karcinomu. První kultura izolovaných buněk se nazývá primokultura. Po první pasáži buněk (tzn. poté, co se buňky namnoží a jsou přeneseny do nových kultivačních nádob) vzniká sekundární kultura buněk. V sekundární kultuře se buňky pěstují do doby, než je získáno dostatečné množství buněk pro dané účely. Nádorové buňky většinou nemají omezenou životnost, nepodléhají stárnutí, na rozdíl od normálních buněk.

Buňkám pěstovaným *in vitro* je třeba zajistit vhodné složení kultivačního média. Povrch kultivační nádoby by měl být hydrofilní. Vhodná teplota pro inkubaci buněk je zpravidla 37 °C a do atmosféry v inkubátoru se většinou přidává oxid uhličitý. Relativní vlhkost atmosféry je udržována okolo 90 %.

Kultivační médium je tekutina, ve které rostou buňky. Má do jisté míry napodobovat extracelulární tekutinu. Do média se obvykle přidává krevní sérum, nejčastěji telecí fetální sérum, které bylo použito i v našem případě. Fetální sérum se používá z důvodu přítomnosti růstových faktorů, které podporují dělení buněk. Další složkou kultivačního média jsou anorganické soli, které mají význam pro udržení osmotického tlaku a stálého pH média. Buňky vylučují do média kyselé katabolity. Proto se do médií přidává fenolová červeň, která při poklesu pH pod fyziologickou hodnotu změní barvu na žlutou. Další složkou kultivačního média je glukosa, která slouží jako zdroj energie. Někdy se do kultivačních médií přidávají též antibiotika jako prevence kontaminace bakteriemi. Tento postup však může ovlivnit vlastnosti buněk.

V první fázi (log-fázi) se buňky množí exponenciálně. V druhé fázi (plató) se růst u normálních buněk zpomalí v důsledku kontaktní inhibice. Pokud normální buňky vytvoří na dně kultivační nádoby souvislou vrstvu, jejich množení se zastaví. Nádorové buňky nemají kontaktní inhibici, takže se nepřestanou množit ani po vytvoření souvislé vrstvy. Po delším čase by však buňky začly odumírat v důsledku nedostatečného přívodu živin. Proto se i nádorové buňky musí pasážovat.

Pasážování spočívá v uvolnění přisedlých buněk od dna kultivační nádoby a od sebe navzájem. Část buněk se odmyje a část se přenesse do nové kultivační nádoby

s novým médiem. Održení buněk je možno usnadnit enzymaticky – trypsinem nebo cheletačním činidlem EDTA.

Pro stanovení počtu buněk se používají různé metody. Počet buněk lze stanovit například odhadem při pohledu do kultivační nádoby a odhadnutí poměru povrchu kultivační nádoby, který je pokryt buňkami ku povrchu, který pokryt není. Pro zlepšení odhadu je možno použít též mikroskop. Další, poněkud přesnější metodou je počítání buněk v cytometrické (Bürkerově nebo Türkově) komořce. Tato metoda je poměrně pracná a zdouhavá. Pro rychlejší stanovení přesného počtu buněk je možno použít průtokovou cytometrii. Tato metoda však zase vyžaduje provoz drahého zařízení.

Po spočítání se buňky obvykle zamrazí na teplotu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Takto buňky vydrží životaschopné po dobu několika měsíců až let. Další variantou je zmrazení v tekutém dusíku, kde je možno buňky ponechat podstatně delší dobu. Aby při zamrazování nedošlo k poškození buněk krystaly vody, přidává se do média kryoprotektivum, obvykle DMSO (dimethylsulfoxid) [32].

### 2.7.3 Možnosti aplikace magnetických částic

Magnetické částice, obvykle ve formě magnetické tekutiny, mohou dopraveny dovnitř nádoru nebo do jeho blízkosti jedním ze čtyř způsobů:

- Arteriální injekce: tekutina nesoucí magnetické částice se vstříkne do arteriálního zásobování nádoru. Tato tekutina může vytvářet gely, které zachycují magnetické částice, což často způsobuje zastavení přívodu krve do nádoru. Modalita léčby jaterních malignit na základě tohoto pojetí se nazývá arteriálně embolizační hypertermie (AEH) [26].
- Přímá injekce: magnetická tekutina se vstříkne přímo do nádoru. Částice se nacházejí v nádorové tkáni a většina z nich je v intersticiálním prostoru, zbytek pak v cévách nebo intracelulárně. Na povrch nanočástic mohou být navázané tumor specifické protilátky, pro podporu zadržování nanočástic v nádoru [26].
- Chirurgická implantace: feromagnetické částice jsou implantovány během chirurgického zákroku do nádoru. Velikost částic se pohybuje v řádu několika milimetrů. Aby se předešlo přehřátí a snížila se potřeba invazivní ter-



mometrie, používají se různé druhy slitin k nastavení požadované Curieovy teploty. Tato tzv. intersticiální implantační hypertermie se aplikuje pro léčbu nádorů mozku [26].

- Aktivní zacílení: nanočástice jsou buď cílené protilátkami specifickými pro nádor poskytující selektivní vazbu na nádorové buňky, nebo pomocí gradientu vnějšího magnetického pole (magnetickým zaměřováním) [26].

#### 2.7.3.1 Zadržování nanočástic v nádoru

Nanočástice o velikosti 20 nm až 200 nm se mohou extravazovat a hromadit uvnitř intersticiálního prostoru [8]. Pasivní zadržování nanočástic v mikroprostředí nádoru je známo už od druhé poloviny 80. let. Nanočástice do buněk nádoru difundují skrze fenestrováný endotel nádorových kapilár [25]. Endoteliální póry mají rozměry 10 nm až 1000 nm. Kromě toho v nádoru chybí lymfatické cévy nebo nejsou funkční, což přispívá k snížení účinnosti odplavení z nádorové tkáně. Nanočástice vstupující do nádoru nejsou účinně odstraněny, a tak zůstávají v nádoru. Tento pasivní jev se nazývá "Enhanced Permeability and Retention (EPR)" a objevili ho Matsumura a Maeda [8]. Retence nanočástic v nádoru je tedy dosaženo díky zvýšené vaskulární permeabilitě, tvorbě defektních cév s velkými fenestracemi a nedostatečně vyvinutému lymfatickému systému v nádoru (není schopný odvádět nanočástice). Tento efekt umožňuje akumulaci nanočástic v pětikrát až desetkrát vyšší koncentraci v nádoru ve srovnání s normálními tkáněmi [25].

#### 2.7.4 Cytokiny

Cytokiny jsou malé proteiny, které jsou uvolňovány různými buňkami v těle, obvykle v reakci na aktivační stimul, a které vyvolávají odpověď prostřednictvím vazby na specifické receptory. Cytokiny mohou působit autokrinním způsobem, přičemž působí na chování buňky, která uvolňuje cytokin, nebo parakrinně - působí na sousední buňky. Díky snaze vyvinout standardizovanou nomenklaturu pro molekuly vylučované leukocyty a působící na leukocyty, se mnoho cytokinů se nazývá jménem interleukin (IL), po kterém následuje číslo (například IL-1 nebo IL-2). V tomto systému však nejsou zahrnuty všechny cytokiny [18].

IL-1 se týká dvou proteinů, IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , které jsou produkty odlišných genů, ale jsou rozpoznávány stejnými receptory buněčného povrchu. IL-1 je silný imunomo-

	funkce	produkční buňky
IL-1 $\beta$	horečka, aktivace T-lymfocytů a makrofágů	makrofágy, epiteliální buňky
IL-10	inhibuje syntézu prozánětlivých cytokinů IL-1 a TNF	makrofágy [20], dendritické buňky, T lymfocyty, a B lymfocyty
IL-2	proliferace a diferenciací T-lymfocytů	T lymfocyty
TNF- $\alpha$	podpora při zánětu	macrofágy, NK buňky, T lymfocyty

Tabulka 2.1: Měřené cytokiny [18]

dulátor, který zprostředkovává šíření imunitních a zánětlivých odpovědí včetně aktivace B a T buněk [2].

Myší IL-10 byl původně popsán jako CSIF (Cytokine Synthesis Inhibitory Factor) kvůli své schopnosti inhibovat produkci cytokinů. IL-10 je exprimován v aktivovaných CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T buňkách, aktivovaných monocyttech, mastocytech a Ly-1 B buňkách. IL-10 sdílí více než z 80 % sekvenční homologii s proteinem BCRFI viru Epstein-Barr. Funkce IL-10 zahrnují inhibici makrofágově zprostředkované syntézy cytokinů a potlačení opožděného typu hypersenzitivní reakce [3]. Další funkcí IL-10 je inhibice metastází nádorů u myší prostřednictvím mechanismu závislého na NK buňkách [38].

Myší IL-2 je silný růstový faktor, který vykazuje svou biologickou aktivitu primárně na T buňkách. IL-2 napodobuje růst a diferenciaci B lymfocytů, NK buněk, buněk LAK, monocytů a oligodendrocytů [4].

Myší TNF- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) je silný multifunkční cytokin, který může mít regulační, zánětlivé a cytotoxické účinky na širokou škálu normálních lymfoidních a nelymfoidních buněk a nádorových buněk. TNF- $\alpha$  je sekretován makrofágy, monocyty, neutrofilů, T-buňkami (primárně CD4<sup>+</sup> T buňkami), NK-buňkami a mnoha transformovanými buněčnými liniemi [5].

## CÍLE A HYPOTÉZY

---

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv superparamagnetických nanočástic při hypertermii a optimalizovat metodologii experimentu pro budoucí výzkum.

Vložením superparamagnetických nanočástic do nádoru před ošetřením pomocí mikrovlnné hypertermie, bychom měli hypoteticky docílit selektivního ohřevu oblasti v okolí nanočástic, které v důsledku periodicky se opakujících změn magnetického pole generují teplo. Takto by bylo dosaženo zefektivnění mikrovlnné hypertermie.

Metodologie potřebná pro realizaci tohoto experimentu zahrnuje přípravu či výběr vhodného aplikátoru a modelu biologické tkáně, umístění nanočástic do tohoto modelu (fantomu), přípravu biologického materiálu pro testování, která spočívá v kultivaci a aplikaci nádorových buněk, umístění nanočástic do nádoru, měření teplotních změn a vyhodnocení účinků tepla případně elektromagnetického pole případně nanočástic na imunitní systém.

Zvýšením tělesné teploty by mělo dojít k aktivaci některých složek imunitního systému.

## METODY

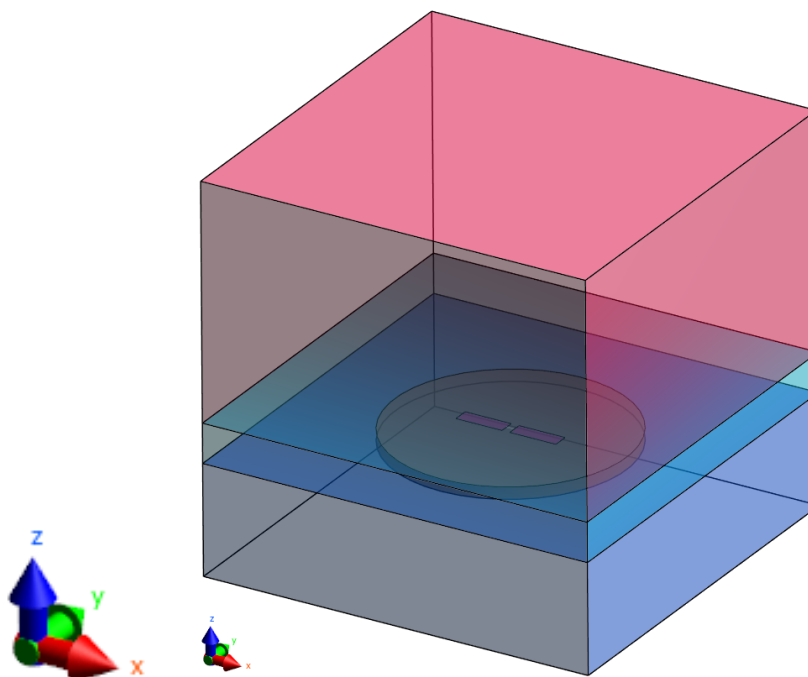
---

### 4.1 SIMULACE ROZLOŽENÍ SAR

V rámci přípravy experimentální aplikace mikrovlnné termoterapie jsme provedli porovnání prostorového rozložení SAR ve fantomu svalové tkáně u tří planárních aplikátorů. Simulace mikrovlnného ohřevu agarového fantomu disponujícího vodním bolusem byly provedeny v simulačním programu Sim4Life. K výpočtu elektromagnetického pole, ze kterého je potom vypočítán SAR a  $S_{11}$  parametr, používá program metodu FDTD (metoda konečných diferencí v časové oblasti), která je založená na mapování elektromagnetického pole v diskrétních intervalech prostoru a času pomocí numerického modelování.

Nejprve jsme provedli simulace prostorového rozložení SAR v homogenním fantomu svalu pro námi vyrobený aplikátor. Po vytvoření geometrie antény a fantomu jsme nastavili parametry použitých materiálů a definovali fyziku simulací. Pro nastavení parametrů použitých materiálů jsme využili vlastní databázi programu Sim4Life, která čerpá z databáze IT'IS Foundation. K diskretizaci numerického modelu využívá program krychlovou síť. Pro výpočet byl nastaven výkon 5 W, frekvence 2,45 GHz a doba expozice 5 minut.

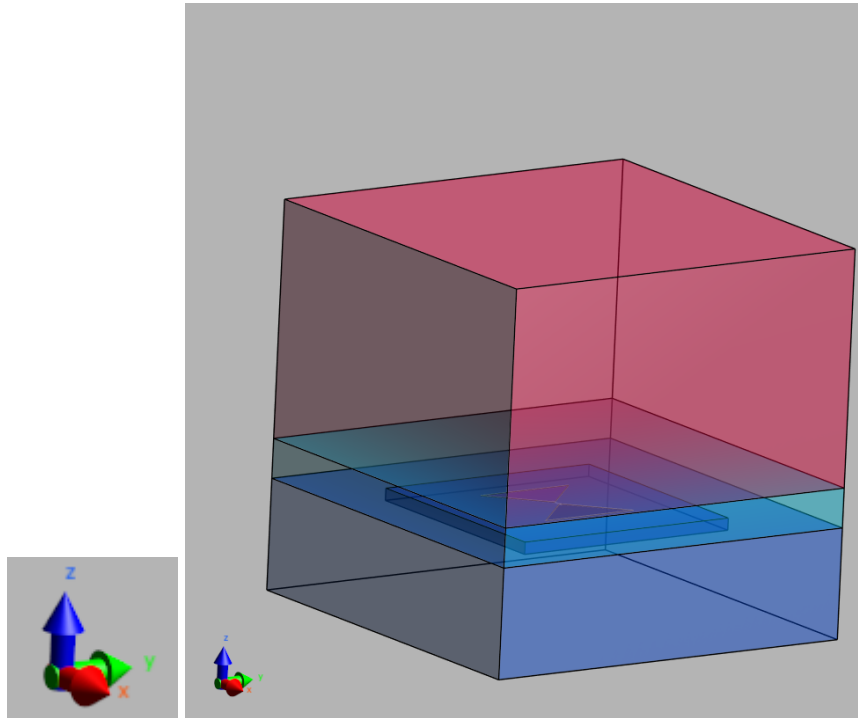
**Obrázek 4.1** ukazuje model aplikátoru typu dipól (vytvořený ze dvou čtvrtvlnných páskových vodičů) s vodním bolusem a fantomem homogenní svalové tkáně vykreslený v programu Sim4life.



Obrázek 4.1: Model vyrobeného aplikátoru

- Rozměry substrátu (kruhový útvar):  $x = 30 \text{ mm}$ ,  $y = 30 \text{ mm}$ ,  $z = 1,5 \text{ mm}$
- rozměry pokovení na substrátu:  $x = 6 \text{ mm}$ ,  $y = 2 \text{ mm}$ ,  $z = 0 \text{ mm}$
- Rozměry vodního bolusu (modrý proužek):  $x = 50 \text{ mm}$ ,  $y = 50 \text{ mm}$ ,  $z = 5 \text{ mm}$
- Rozměry fantomu (horní část kvádru, v červené barvě):  $x = 50 \text{ mm}$ ,  $y = 50 \text{ mm}$ ,  $z = 30 \text{ mm}$

Obrázek 4.2 ukazuje model aplikátoru typu radiální dipól (tzv. „motýlek“) poskytnutý laboratoří mikrobiologického ústavu AVČR.

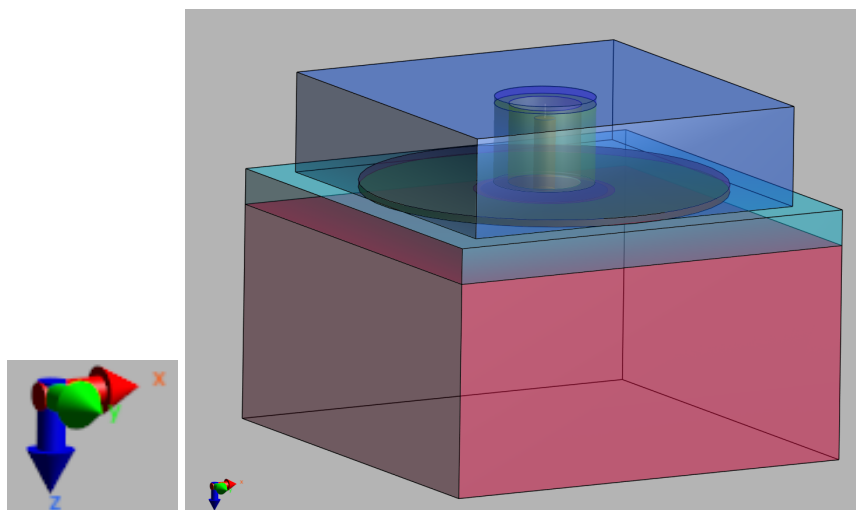


Obrázek 4.2: Model aplikátoru typu motýlek

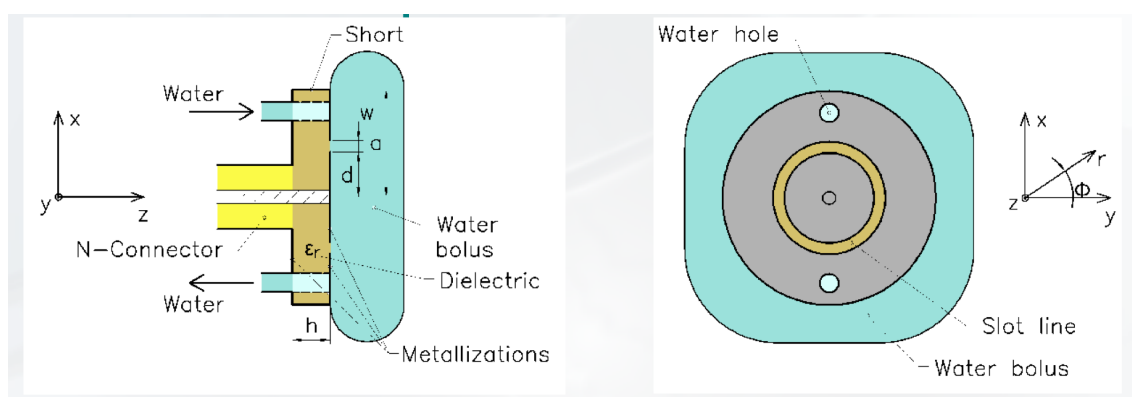
- Rozměry substrátu:  $x = 30 \text{ mm}$ ,  $y = 30 \text{ mm}$ ,  $z = 1,5 \text{ mm}$
- Rozměry pokovení na substrátu: výška obou rovnoramenných trojúhelníků je  $6,5 \text{ mm}$ , délka přepony je  $13 \text{ mm}$
- Rozměry vodního bolusu:  $x = 50 \text{ mm}$ ,  $y = 50 \text{ mm}$ ,  $z = 5 \text{ mm}$
- Rozměry fantomu:  $x = 50 \text{ mm}$ ,  $y = 50 \text{ mm}$ ,  $z = 30 \text{ mm}$

Obrázek 4.3 ukazuje model štěrbinového aplikátoru poskytnutého katedrou elektromagnetického pole na ČVUT.

- Rozměry substrátu: poloměr:  $25,5 \text{ mm}$ , výška:  $1 \text{ mm}$
- rozměry a poloha štěrbin: vzdálenost od středu k vnitřnímu okraji štěrbin:  $18,75 \text{ mm}$ , vzdálenost od středu k vnějšímu okraji štěrbin:  $9,75 \text{ mm}$
- Rozměry vodního bolusu:  $x = 60 \text{ mm}$ ,  $y = 60 \text{ mm}$ ,  $z = 5 \text{ mm}$
- Rozměry fantomu:  $x = 60 \text{ mm}$ ,  $y = 60 \text{ mm}$ ,  $z = 30 \text{ mm}$



Obrázek 4.3: Model štěrbinového aplikátoru



Obrázek 4.4: Schéma štěrbinového aplikátoru [29]

#### 4.2 VÝROBA APLIKÁTORU

Na keramický substrát s měděnou vrstvou jsme přilepili masku dipólu. Aplikovali jsme lak citlivý na UV záření. Lak jsme vytvrdili na 70 °C. Dále jsme substrát s měděnou vrstvou a maskou vystavili UV záření po dobu dvou minut. Poté jsme odlepili masku, odmyli lak pomocí roztoku NaOH zředěného v poměru 7 g/l. Lak se odmyl všude kromě dipólu, na němž byla maska. Nakonec jsme celou destičku ponořili do roztoku chloristanu železitého, který odleptal měděnou vrstvu všude, kromě místa chráněného lakem. Lak, který zůstal na dipólu jsme potom odmyli acetonem.

Konektorem jsme připevnili koaxiální kabel k dipólu.



### 4.3 EXPERIMENTÁLNÍ MODELOVÁNÍ TEPLOTNÍ DISTRIBUCE

Pro experimentální modelování teplotní distribuce se používají speciální uměle připravené fantomy, které mají simulovat elektrické a teplotní parametry biologických tkání [37].

#### 4.3.1 Model (fantom) svalové tkáně

Nejprve byl vytvořen fantom z jedlé želatiny (bílkovina živočišného původu). Pro jeho přípravu bylo použito 400 ml vody, 20 g želatiny v prášku a 3 g soli kuchyňské. Velkou výhodou želatinového fantomu byla jeho průhlednost. Této vlastnosti bylo možno využít při aplikaci termočlánků. Jeho velkou nevýhodou však byla značně nedostatečná tuhost, která působila komplikace při jakékoli manipulaci, a nízká trvanlivost v důsledku osychání na povrchu. Proto jsme přešli k testování pomocí agarového fantomu, se kterým se snadněji manipulovalo a byl trvanlivější. Agarový fantom byl vyroben z 3 g soli kuchyňské, 40 g agaru a 1 l vody.

#### 4.3.2 Určení parametrů pro aplikátory a fantomy

Pomocí vektorového analyzátoru Keysight FieldFox (Obrázek 4.5) se sondou DAK 12 (Obrázek 4.6) jsme určili činitel odrazu ( $S_{11}$  parametr) při vyzařování do agarového fantomu u všech tří aplikátorů.

Dále bylo potřeba určit dielektrické parametry (specifickou vodivost a relativní permitivitu) použitých fantomů.

#### 4.3.3 Ověření teplotní distribuce

Ověření teplotní distribuce jsme provedli pomocí termokamery FLIR, která měří teplotu na principu Max-Planckova vyzařovacího zákona [37]. Po pětiminutové mikrovlnné expozici o výkonu 5 W bylo třeba neprodleně provést příčný řez fantomu a vyfotografovat termokamerou. Testování termokamerou však umožňuje ověření teplotní distribuce pouze ve vertikálním směru. Porovnání všech tří aplikátorů jsme proto provedli pomocí porovnání tvaru a míry koagulace vaječného



Obrázek 4.5: Vektorový analyzátor Keysight FieldFox

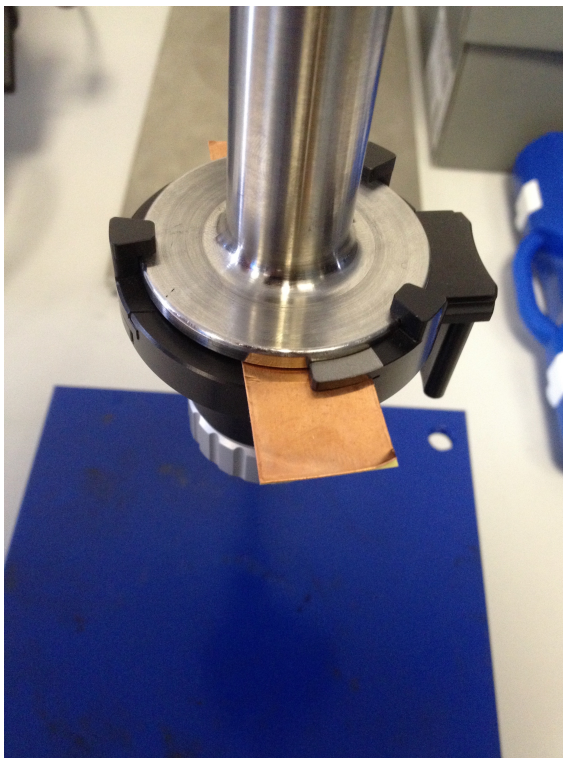
bílku pro každý aplikátor za stejných podmínek, tedy při výkonu 5 W po dobu 5 minut.

#### 4.4 OVĚŘENÍ TEPELNÉHO EFEKTU NANOČÁSTIC

Pro ověření tepelného efektu nanočástic bylo třeba vyřešit problém stejného experimentálního nastavení pro každý pokus.

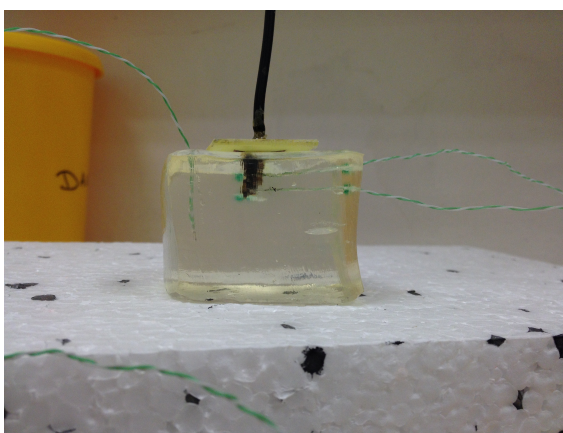
Zpočátku jsem pracovala s želatinovým fantomem. Bylo potřeba vytvořit dva fantomy stejných rozměrů. Jeden byl kontrolní bez nanočástic, do druhého jsem aplikovala nanočástice.

Superparamagnetické nanočástice v injekční vodě (destilovaná, deionizovaná voda) jsem aplikovala injekční stříkačkou s jehlou do želatinového fantomu během jeho přípravy - ve fázi tuhnutí. Bylo totiž potřeba zajistit, aby nanočástice nepropadly na dno nádoby - to by nastalo v případě, že by byly aplikovány do příliš teplého (neztuhlého) fantomu. Zároveň však nebylo žádoucí vyčkat do úplného zatuhnutí fantomu, protože v tom případě roztok s nanočásticemi vytekl ven otvorem vytvořeným jehlou při aplikaci. Při injekci nanočástic bylo potřeba postupovat velmi pomalu, abychom dosáhli kompaktní distribuce v co nejmenším

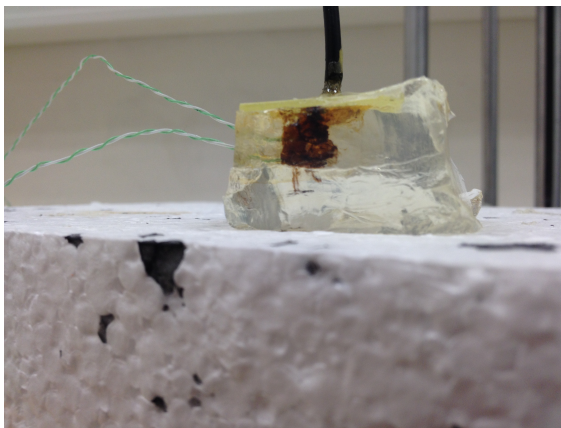


Obrázek 4.6: Sonda DAK 12

objemu. I při dodržení výše uvedeného postupu však nebylo snadné dosáhnout požadovaného a hlavně replikovatelného výsledku. Při opakování experimentu jsme dosáhli pokaždé jiné distribuce nanočástic v agaru. I zavedení termočlánků vždy na stejné místo bylo poměrně komplikované. [Obrázek 4.7](#) a [Obrázek 4.8](#) ukazují, že distribuce nanočástic ve dvou případech není srovnatelná. A protože nebylo možné použít stejný želatinový fantom pro více pokusů kvůli jeho nedostatečné trvanlivosti, bylo nutné přejít na jiný experimentální setup.



Obrázek 4.7: Distribuce nanočástic v želatinovém fantomu při jednom z pokusů



Obrázek 4.8: Distribuce nanočástic v želatinovém fantomu při jiném z pokusů

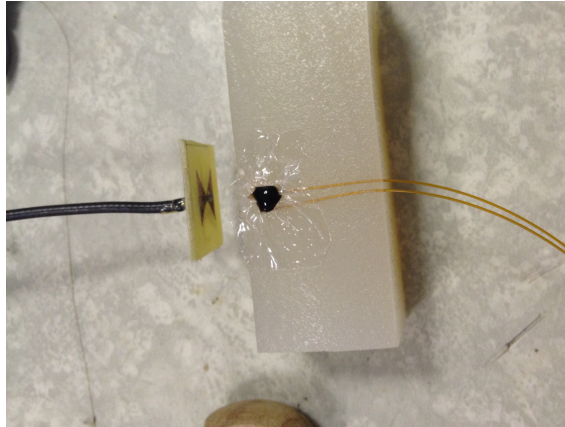
Jako druhý jsme použili fantom z agaru, s kterým se podstatně lépe pracovalo. Byly vyzkoušeny ještě další metody aplikace nanočástic, jako například vytvoření otvoru ve fantomu, vložení fólie na dno tohoto otvoru, vyplnění otvoru tekutinou s nanočásticemi (Obrázek 4.9) a následné překrytí vrstvou agarového fantomu. Ani tento postup se však neukázal jako optimální.

Jako nejpřesnější a nejlépe replikovatelná metoda se ukázala aplikace nanočástic do agarového fantomu v mikrozku-mavkách. Mikrozku-mavka byla do fantomu vložena před jeho zatuhnutí. Po zatuhnutí bylo možno mikrozku-mavku vyjmout a naplnit nanočásticemi. Na dno mikrozku-mavky pak byl umístěn termočlánek, který po dobu expozice snímal teplotu z jednoho přesně definovaného místa přímo v roztoku s nanočásticemi. Po vychladnutí fantomu na původní teplotu před expozicí mohla být mikrozku-mavka s nanočásticemi vyměněna za kontrolní mikrozku-mavku s vodou. Obě mikrozku-mavky byly samozřejmě stejných rozměrů i dielektrických vlastností. Na dno mikrozku-mavky byl opět umístěn termočlánek. Při tomto experimentálním nastavení (Obrázek 4.10) jsme měli záruku, že jsou nastaveny stejné podmínky pro kontrolní i testovaný vzorek v mikrozku-mavce.

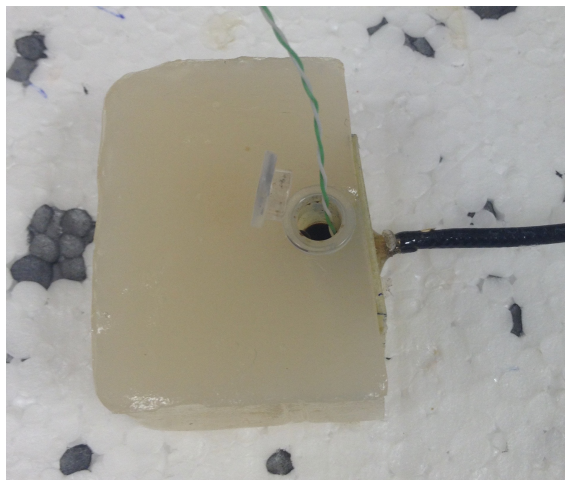
#### 4.5 KULTIVACE NÁDOROVÝCH BUNĚK

Buňky CT26, které jsme kultivovali (Obrázek 4.11), jsou buňky kolorektálního karcinomu myši BALB/c. Při práci s buňkami bylo nezbytně nutné dodržovat přísná opatření zabraňující kontaminaci kultur bakteriemi či plísněmi. Tato práce zahrnovala výměnu média dvakrát až třikrát týdně (pokud bylo médium žluté vlivem



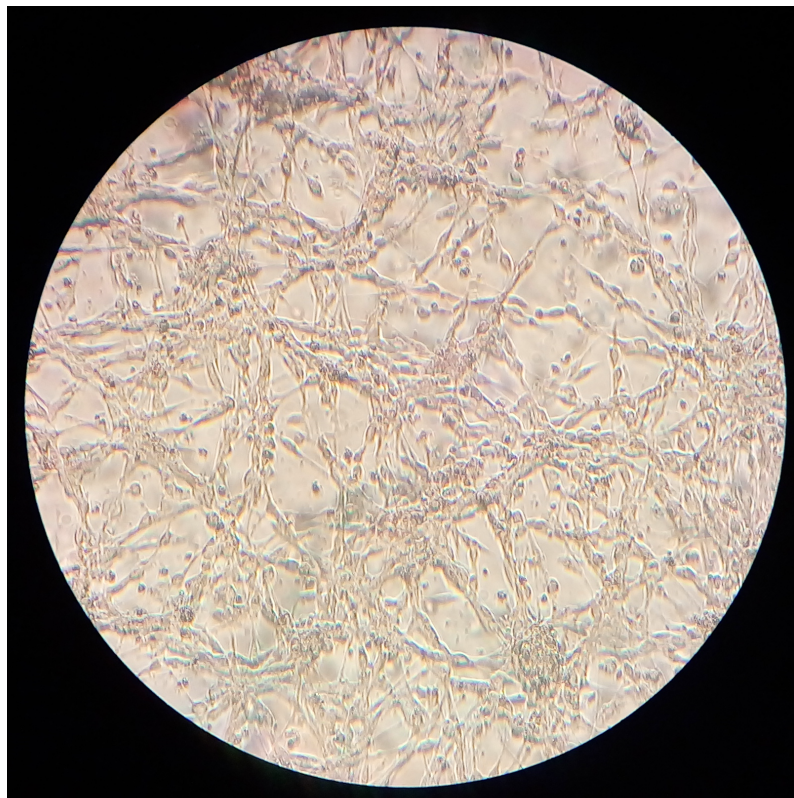


Obrázek 4.9: Další metoda experimentálního nastavení (agarový fantom)



Obrázek 4.10: Vítězné experimentální nastavení

kyselých katabolitů buněk, bylo pipetou odsáto a vyměněno za 10 ml čerstvého média) a pasážování buněk cca jednou týdně. V zorném poli mikroskopu jsme zkontrolovali stav buněk a pasážovali jsme v případě, že byla vytvořena souvislá vrstva buněk na dně kultivační nádoby. Pasážování jsme provedli uvolněním přisedlých buněk od povrchu a přenesením do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem. Uvolnění od povrchu bylo možno u buněk CT26 provést i pouze mechanicky - proudem kultivačního média z pipety. Počítání buněk před zamrazením jsme provedli pomocí Bürkerovy komůrky. Po spočítání jsme buňky uložili do hlubokomrazicího boxu o teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  a uschovali pro pozdější aplikaci myším. Aby nedošlo k poškození buněk mrazem, použili jsme kryoprotektivum DMSO. Po rozmrazení byly nádorové buňky aplikovány osmi myším (1 milion buněk na myš). Nádory myším vyrostly do požadované velikosti za 10 dní.



Obrázek 4.11: Buňky CT26, 80x

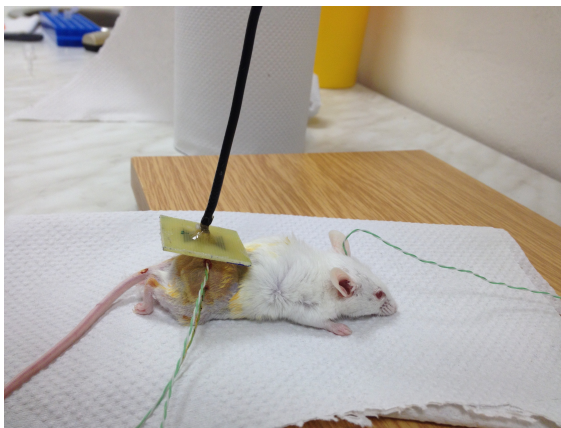
#### 4.6 APLIKACE SUPERPARAMAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC DO NÁDORU

Testované myši měly pod kůží na zádech nádory o průměru cca 25 mm. Před ošetřením jsem myším podala anestetikum (70  $\mu$  l směsi ketaminu a xylazinu). Oblast nádoru jsem vyholila a vydezinfikovala betadinem.

Do hloubky cca 7 mm v nádoru jsem aplikovala 100  $\mu$ l superparamagnetických nanočástic  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  bez povrchové modifikace. Koncentrace nanočástic v roztoku byla 4,4 mg/ml. Kontrolní myši jsem aplikovala 100  $\mu$ l PBS - fosfátový pufr (fyzilogický roztok).

Do nádoru jsem voperovala dva termočlánky. Jeden byl umístěn do spodní části nádoru, tedy do hloubky cca 15 mm a druhý do blízkosti povrchu, do hloubky cca 3 mm v nádoru. Oba termočlánky jsem se pokusila umístit tak, aby byly kolmo ke směru šíření elektromagnetického pole. Do ucha jsme aplikovali třetí termočlánek pro měření změny systémové tělesné teploty.

Nad nádor byl umístěn planární aplikátor typu bowtie spojený koaxiálním kabelem s mikrovlnným generátorem Sairem pracujícím na frekvenci 2,45 GHz. Na generátoru jsem nastavila výkon 5 W.



Obrázek 4.12: Experimentální nastavení s laboratorním zvířetem

Po dobu 5 min byla zaznamenávána teplota z obou termočlánků do termometru, který posílal informaci počítači, kde byla data ukládána v nastaveném intervalu 5 sekund. Pokud by došlo k překročení termoterapeutické teploty zaznamenané minimálně u jedním z termočlánků  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , generátor byl okamžitě vypnut. Po vychladnutí na minimální termoterapeutickou teplotu  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  jsem generátor opětovně zapla.

Termoterapeutická teplota byla udržována po dobu 5 minut se stejným postupem u kontrolní myši. Po vychladnutí nádoru na původní teplotu bylo zkontrolováno místo kontaktu aplikátoru s kůží zvířete. Na kůži nebyly patrné změny způsobené tepelným poškozením pravděpodobně v důsledku relativně nízkého výkonu. Po kontrole jsme zopakovali aplikaci výkonu ještě dvakrát se stejným postupem a u obou myší.

Závěrem byla odebrána krev a provedena eutanazie obou myší. Odebraná krev byla přenesena do mikrozkušavky typu Eppendorf a po dobu 45 minut byla ponechána při pokojové teplotě. Myši byl odebrán nádor a zakonzervován v paraformaldehydu v chladničce při  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro budoucí histologické vyšetření, kterým bych chtěla navázat v dalším studiu.

Po 45 minutách v pokojové teplotě jsme mikrozkušavky s krví umístili do rotoru centrifugy Hermle Labortechnik GmbH vychlazené na  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  naproti sobě tak, aby byl rotor vyvážený. Centrifugace krve probíhala po dobu 30 minut při odstředivém zdrchlení  $1500\text{ g}$ , tedy tisíc pěti set násobku tíhového zrychlení, což u použitého rotoru odpovídalo otáčkám  $3500\text{ min}^{-1}$ .

Po vyjmutí z centrifugy jsem pomocí pipety odebrala supernatant (krevní sérum) a přenesla jej do nové popsané mikrozkušavky. Totéž bylo provedeno u krve



kontrolní myši. Tato práce byla provedena v laminárním boxu ve sterilních podmínkách. Uzavřené mikrozkušavky byly přeneseny do hlubokomrazicího boxu a uschovány pro analýzu pomocí testu ELISA.

Tento postup jsme zopakovali celkem u čtyř dvojic myší.

#### 4.6.1 *Ověření koncentrace cytokinů*

Koncentrace cytokinů v krevní plazmě byla stanovena pomocí sendvičového Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Testovali jsme přítomnost následujících cytokinů: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ . Myši IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$  specifickou monoklonální protilátkou se potáhne povrch dvou 96-jamkových destiček. Do jamek se přidají standardy a vzorky a cytokiny se vážou na imobilizované Capture Antibody. Poté se přidá anti-mouse IL-2, IL-10, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  specifická detekční protilátka. Tím se vytvoří sendvič protilátka-antigen-protilátka. Dále se přidá Avidin-křenuvá peroxidáza následovaná TMB Substrátem, který vytváří modrou barvu v závislosti na koncentraci cytokinů přítomných ve vzorku. Na závěr se přidá Stop Solution, který změní barvu reakce z modré na žlutou a pomocí spektroskopu se přečte absorbance pro vlnovou délku 450 nm.

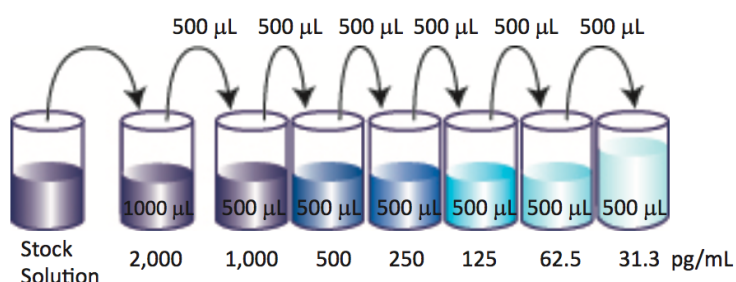
Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) byl proveden z krevního séra myši získaného odběrem krve a následné separaci séra 48 hodin po mikrovlnné terapii u jedné dvojice (kontrola-myš ošetřená nanočásticemi) myši a ihned po expozici u zbylých tří dvojic testovaných myší.

Nejprve jsme upravili koncentrace proteinů ve vzorcích tak, aby byly všechny stejné podle nejméně koncentrovaného vzorku. Koncentrace proteinů v nejméně koncentrovaném vzorku byla spektroskopicky stanovena 37,28 g/l.

Použili jsme dvě 96-jamkové destičky, které jsme označili po tripletech. Do každé jamky jsme přidali 100  $\mu$ l roztoku Capture Antibody (35  $\mu$ l) zředěného v 7 ml PBS (Phosphate-Buffered Saline) pro IL-10 a v 7 ml Coating Bufferu pro zbylé tři cytokiny. Přes noc jsme nechali inkubovat obě uzavřené destičky v chladícím boxu při teplotě 5 °C.

Další den jsme obě destičky promyli čtyřikrát 300  $\mu$ l Wash Bufferu do každé jamky. Po každém promytí bylo vždy nutné vyklepnout zbytky Wash bufferu na savý papír. Každé další promývání probíhalo stejným způsobem.

Pro zablokování nespecifické vazby a redukci pozadí jsme přidali 200  $\mu\text{l}$  Assay Diluentu na jamku, uzavřeli destičku, nechali inkubovat jednu hodinu při pokojové teplotě na destičkovém shakeru. Během blokování destičky jsme si připravili standardní diluční řadu.: Ze zásobního roztoku Assay Diluentu jsme si připravili 500  $\mu\text{l}$  top standartu o koncentraci myšního standartu 2000  $\text{pg/ml}$ . Provedli jsme šestkrát dvojkovou ředící řadu top standartu s Assay Diluentem v oddělených mikrokumavkách. Po naředění jsme tedy měli koncentrace myšního standartu 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,025  $\text{pg/ml}$ . Kalibrační řadu jsme udělali pro všechny čtyři myší standardy. Jen pro IL-2 byly výsledné koncentrace myších standartů jiné: 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2  $\text{pg/ml}$ .

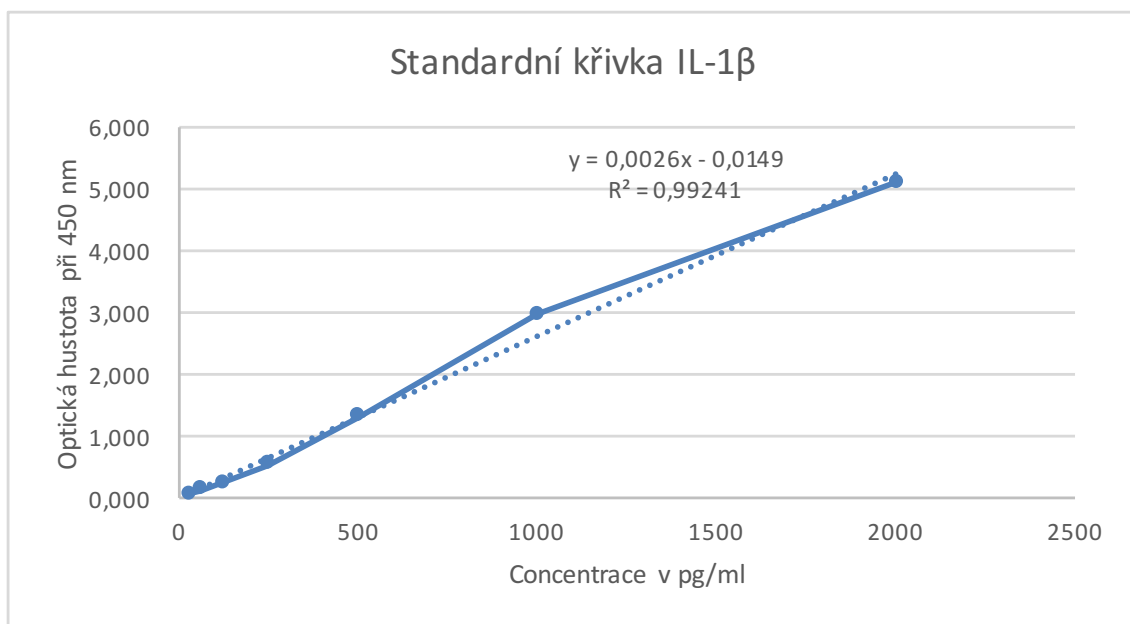
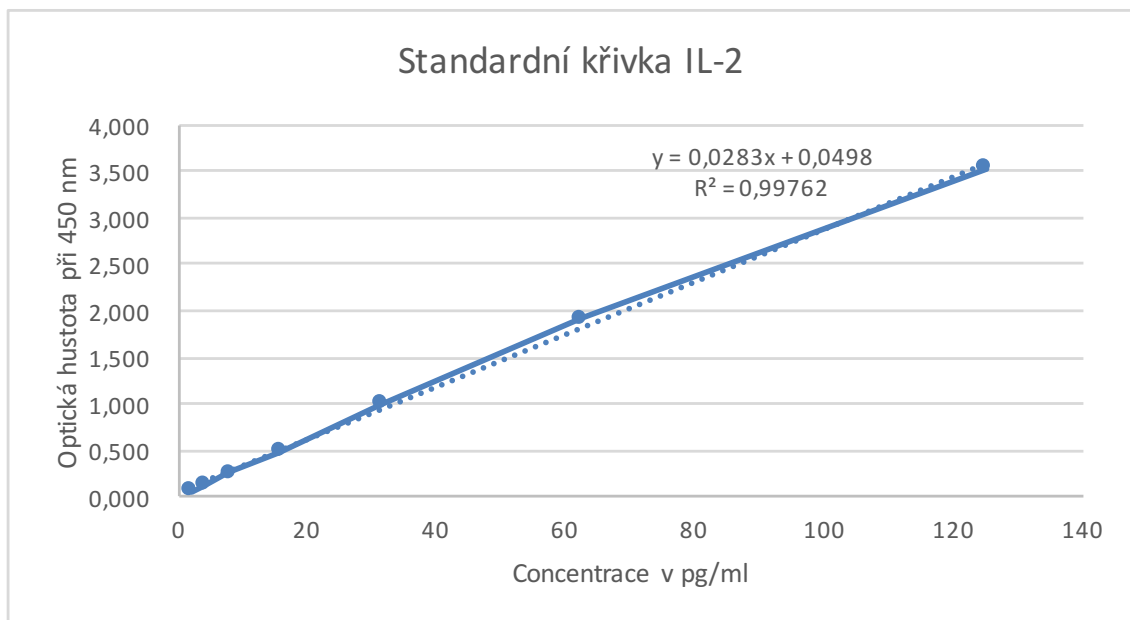


Obrázek 4.13: Kalibrační řada

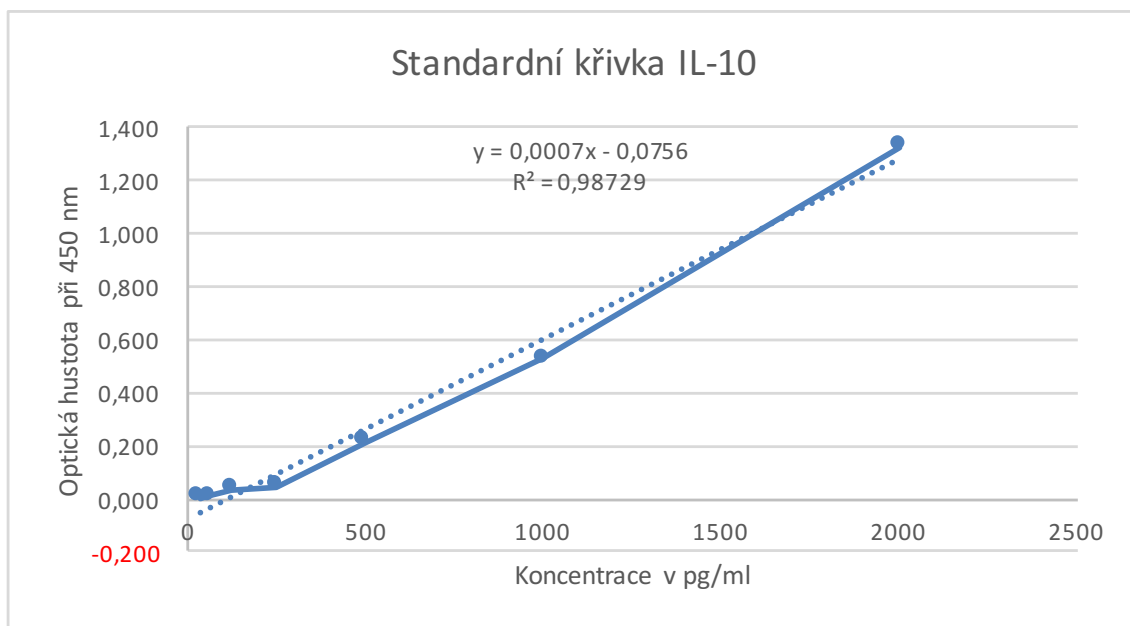
Čtyřikrát jsme promyli obě destičky a přidali 100  $\mu\text{l}$  standardních koncentrací a vzorků do příslušných jamek. Obě destičky jsme uzavřeli a inkubovali 2 hodiny při pokojové teplotě na shakeru. Poté jsme provedli čtyřikrát promytí. Do každé jamky jsme přidali 100  $\mu\text{l}$  naředěné detekční protilátky, uzavřeli jsme destičky a nechali 1 hodinu inkubovat na shakeru při pokojové teplotě. Po promytí (opět čtyřikrát) jsme přidali 100  $\mu\text{l}$  naředěného Avidin-HRP do každé jamky. Destičky jsme uzavřeli a na shakeru nechali při pokojové teplotě inkubovat 30 minut. Obě destičky jsme pětikrát promyli. Přidali jsme 100  $\mu\text{l}$  TMB substrátu a nechali inkubovat ve tmě. Kontrolovali jsme rozvinutí požadované barvy u standardní řady. Pozitivní jamky zmodraly. Reakci jsme zastavili přidáním 100  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pozitivní jamky zežloutly.

Spektroskopicky byla stanovena absorbance pro 450 nm.

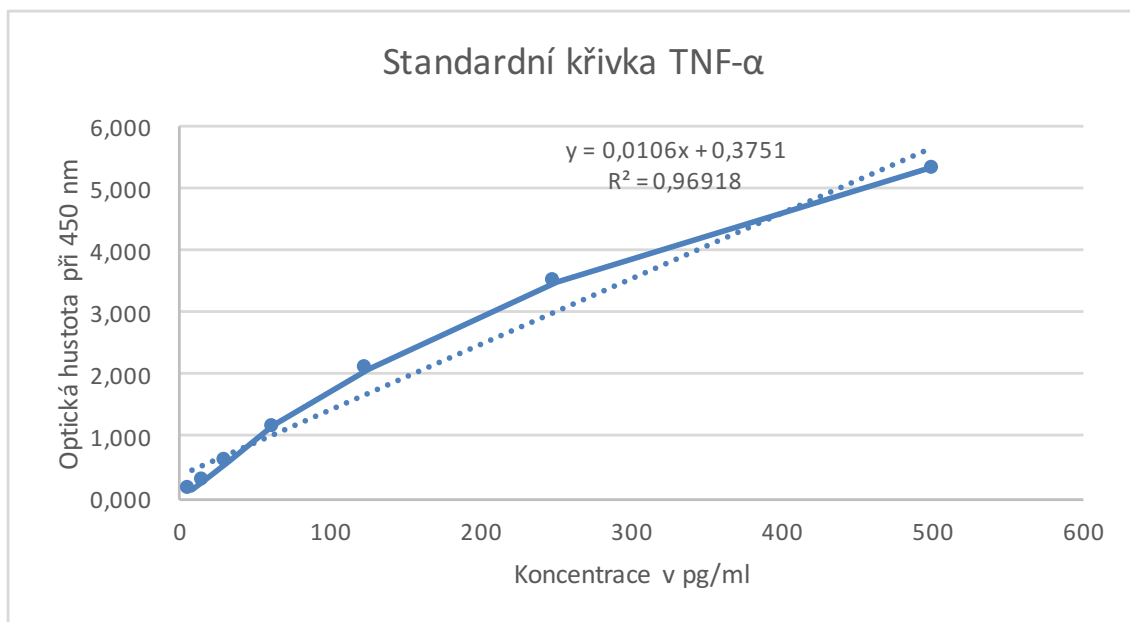
Pro určení koncentrací vzorků jsme použili známé koncentrace u kalibrační řady. Jejich proměřením jsme získali absorbance odpovídající daným koncentracím. Vynesli jsme do grafu závislost koncentrace na absorbanci. Tato funkce by měla být lineární, proto jsme ji proložili přímkou. Z této závislosti potom bylo možno určit koncentrace vzorků.

Obrázek 4.14: Standardní křivka pro IL-1 $\beta$ 

Obrázek 4.15: Standardní křivka pro IL-2



Obrázek 4.16: Standardní křivka pro IL-10

Obrázek 4.17: Standardní křivka pro TNF- $\alpha$

## VÝSLEDKY

---

V této kapitole jsou uvedeny výsledky softwarových simulací parametru  $S_{11}$  a prostorového rozložení SAR ve srovnání s výsledky experimentálního měření těchto veličin. Dále je zde porovnání průběhů teplot pro subjekty s nanočásticemi vystavené mikrovlnnému záření a pro subjekty bez nanočástic vystavené mikrovlnnému záření za stejných podmínek.

V této kapitole jsou uvedeny též výsledky měření dielektrických parametrů dvou druhů testovaných fantomů (Table 5.1)

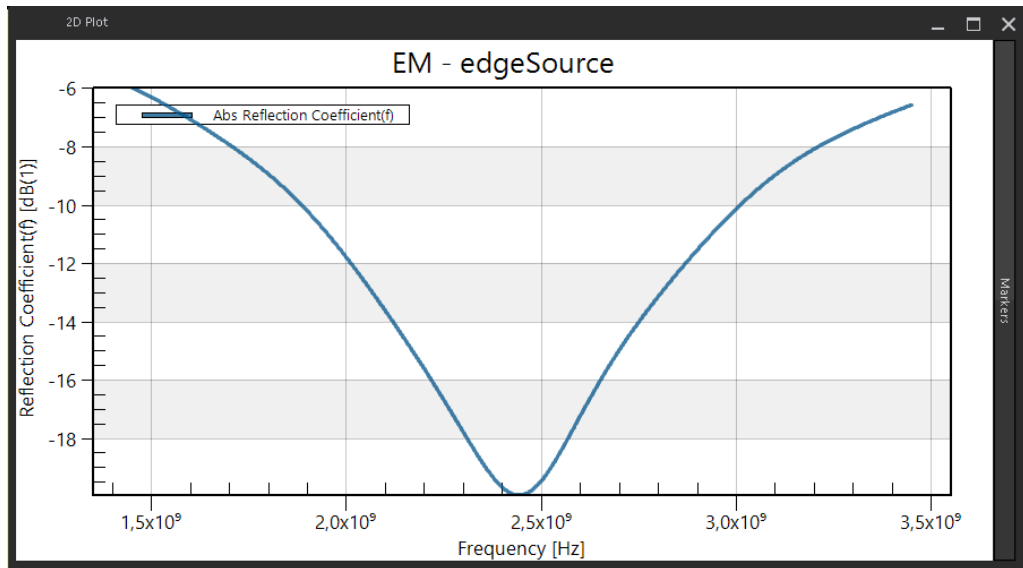
	agarový fantom	želatinový fantom
specifická vodivost	$2,15 \text{ S m}^{-1}$	$1,87 \text{ S m}^{-1}$
relativní permitivita	74,62	75,05

Tabulka 5.1: Dielektrické parametry testovaných fantomů

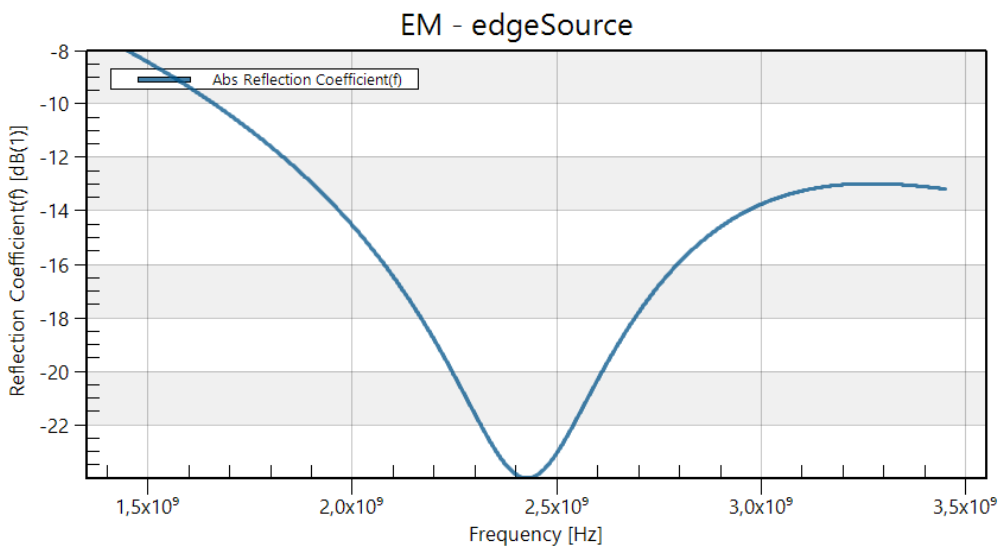
Na závěr je zde přehled výsledků testu ELISA.

### 5.1 VÝSLEDKY SIMULACÍ

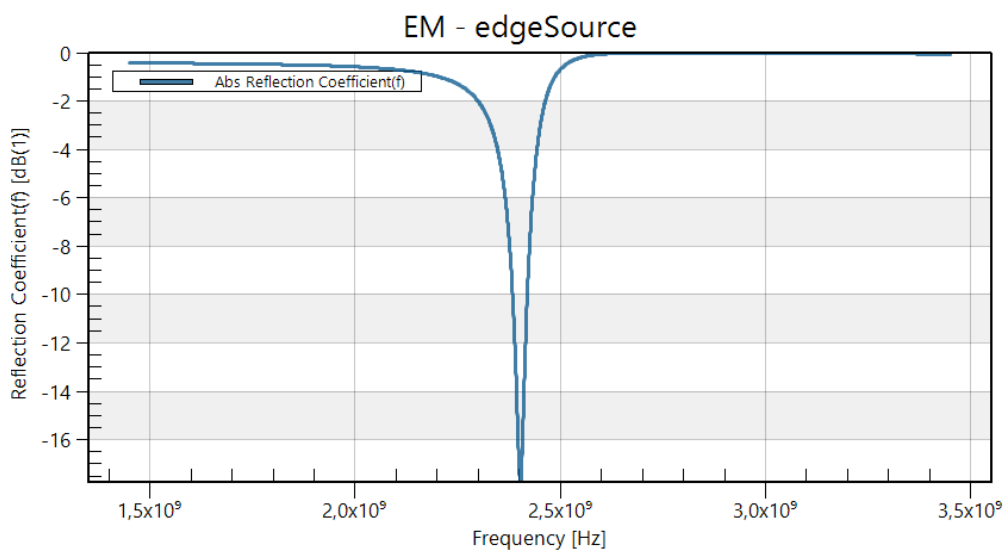
Obrázek 5.1a naznačuje, že virtuální obvod je impedančně přizpůsoben. To znamená, že jsme našli takovou velikost dipólu, aby rezonoval při frekvenci 2,45 GHz. Při této frekvenci tedy dochází k minimálnímu odrazu. Tato funkce vznikne fourierovou transformací vstupního signálu. K minimálnímu odrazu dochází dle simulací i u zbylých dvou aplikátorů (Obrázek 5.1b a Obrázek 5.1c). Modul činitele odrazu na pracovní frekvenci pro vyráběný aplikátor byl na vektorovém analyzátoru naměřen  $-11 \text{ dB}$ . Pro aplikátor typu motýlek  $-14 \text{ dB}$  a pro šterbinový aplikátor  $-15 \text{ dB}$ .



(a) Činitel odrazu pro vyrobený aplikátor



(b) Činitel odrazu pro aplikátor typu motýlek

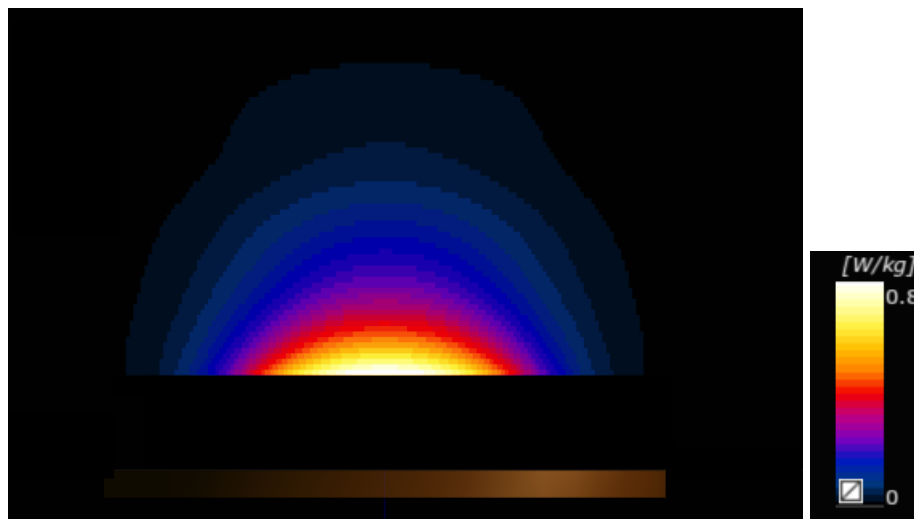
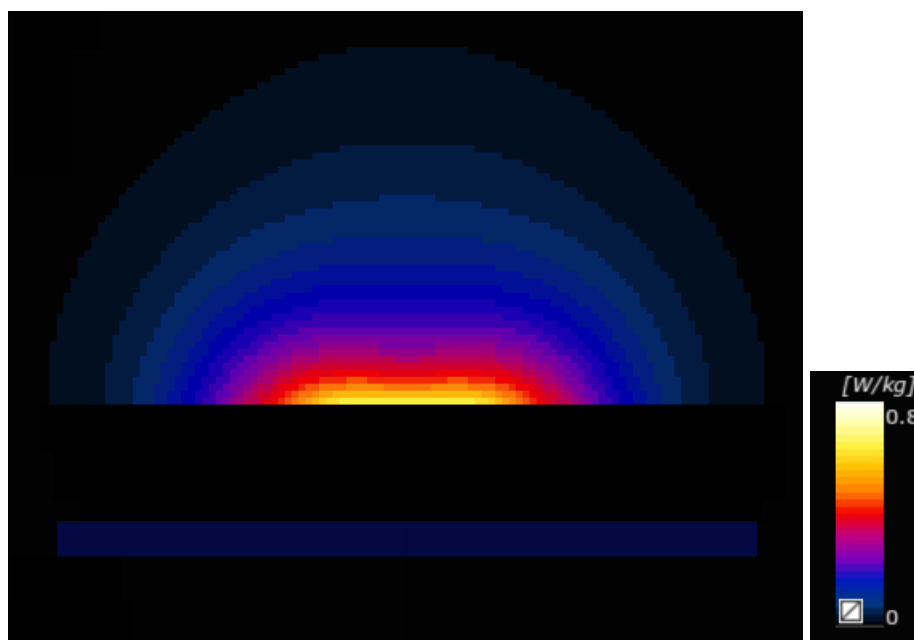
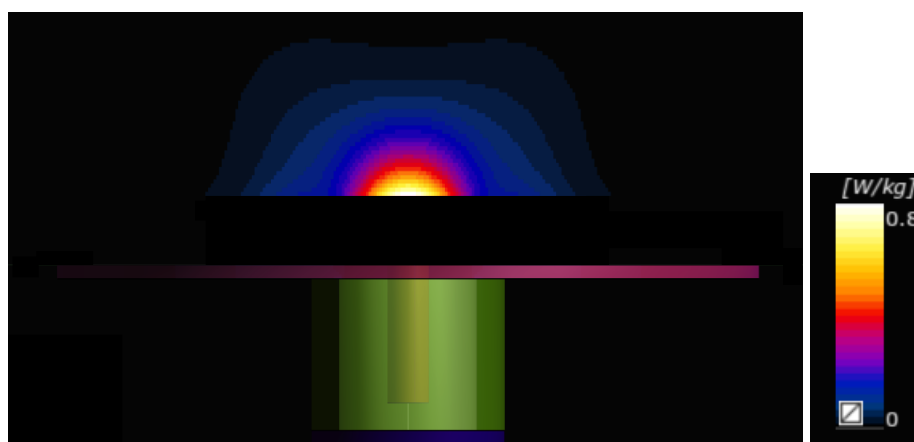


(c) Činitel odrazu pro štěrbinový aplikátor

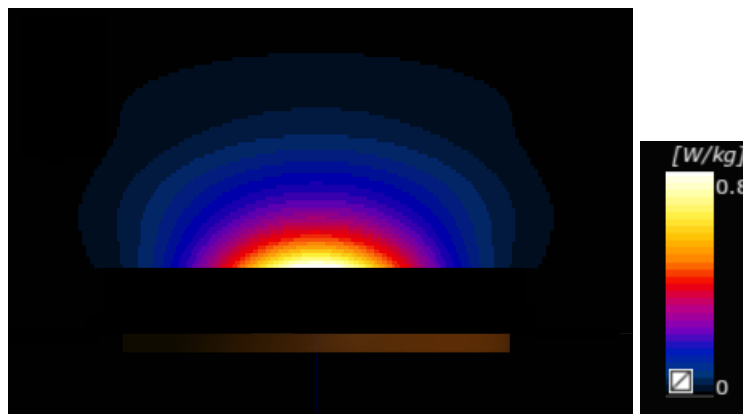
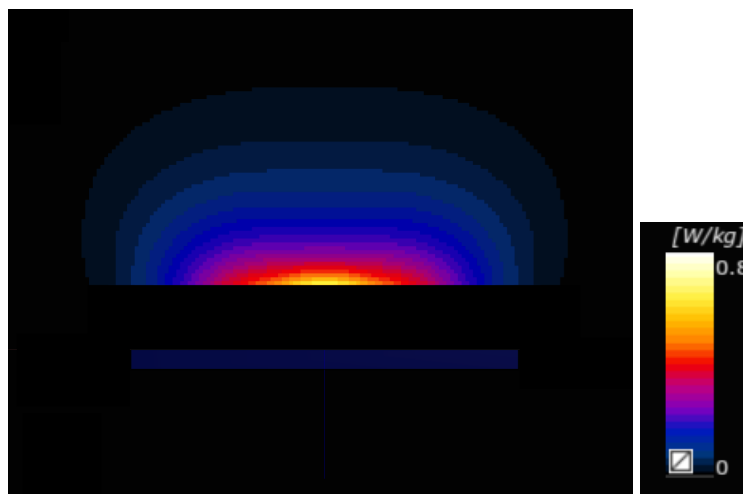
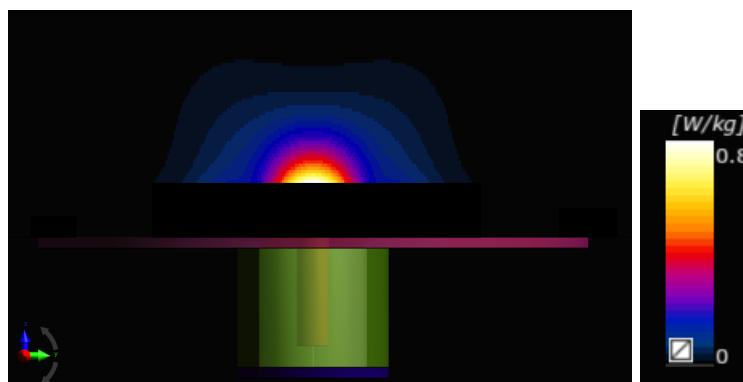
Obrázek 5.1: Parametr S11

Obrázek 5.2 a Obrázek 5.3 ukazují profil SAR od aplikátoru do hloubky 30 mm fantomu ve vertikálním řezu (jednou v souřadnicích xz a podruhé v souřadnicích yz) jednotlivě pro všechny tři aplikátory. V hloubce 5 mm je přechod mezi vodním bolusem a fantomem.



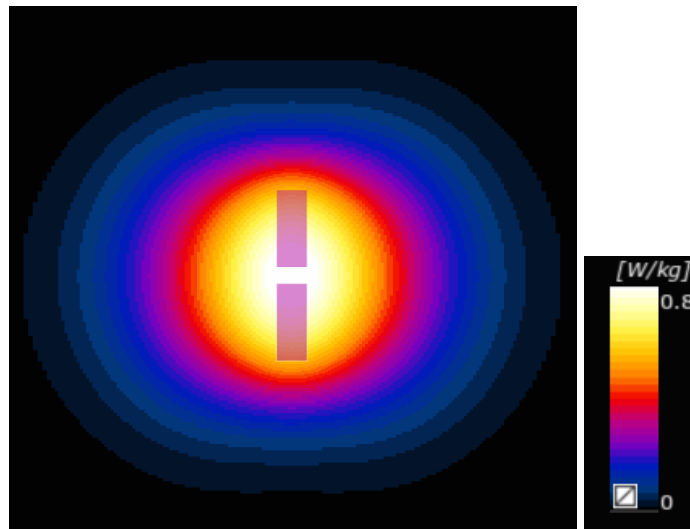
(a) Profil SAR v souřadnicích  $x, z$  vyráběného aplikátoru(c) SAR v souřadnicích  $x, z$  aplikátoru typu motýlek(e) SAR v souřadnicích  $x, z$  štěrbinového aplikátoru

Obrázek 5.2: Profil SAR v souřadnicích XZ

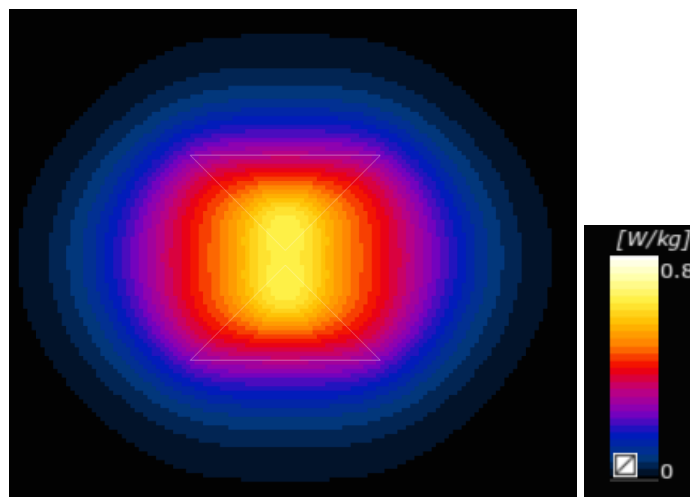
(a) SAR v souřadnicích  $y, z$  vyráběného aplikátoru(c) SAR v souřadnicích  $y, z$  aplikátoru typu motýlek(e) SAR v souřadnicích  $y, z$  štěrbinového aplikátoru

Obrázek 5.3: Profil SAR v souřadnicích YZ

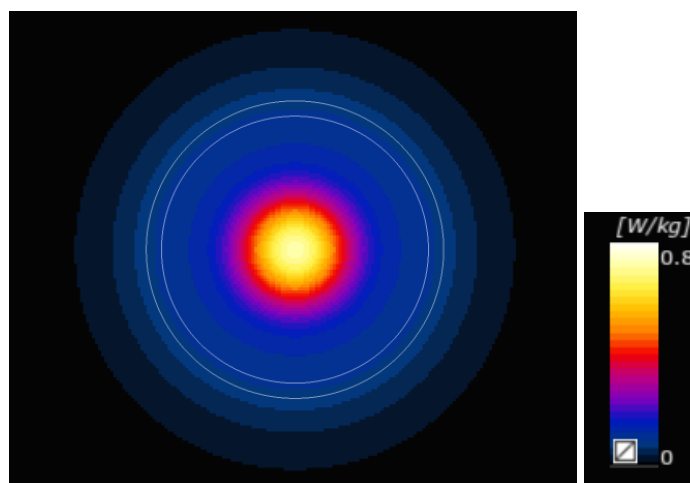
Obrázek 5.4 a Obrázek 5.5 ukazují profil SAR v horizontálním řezu v různých hloubkách opět pro všechny tři aplikátory.



(a) SAR v souřadnicích  $x, y$  v hloubce 5 mm vyráběného aplikátoru

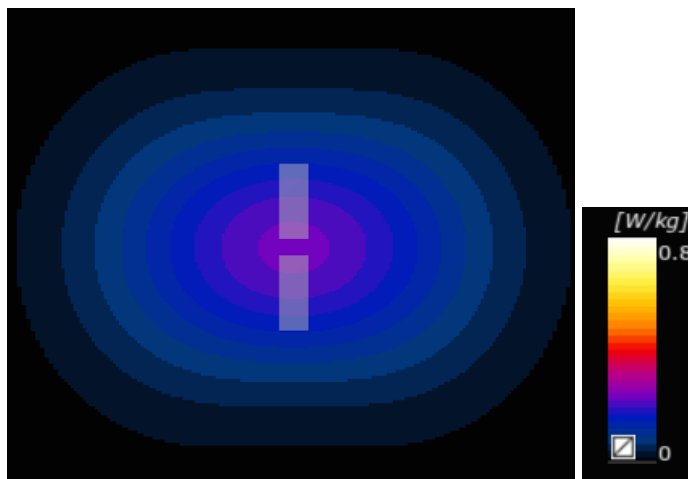


(c) SAR v souřadnicích  $x, y$  v hloubce 5 mm aplikátoru typu motýlek

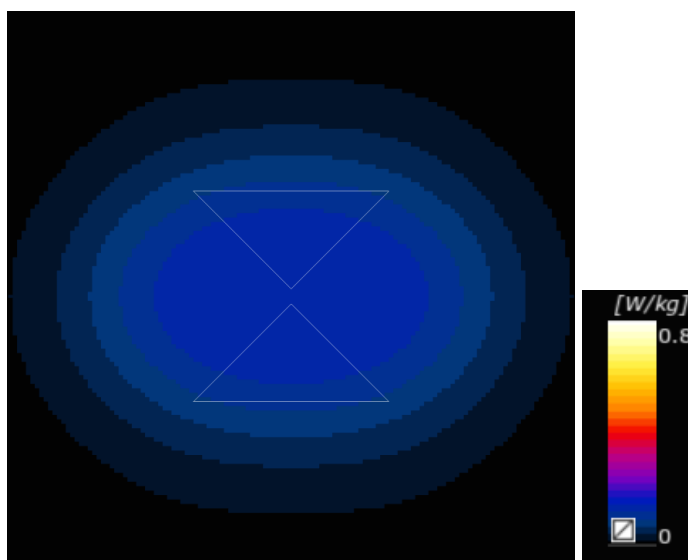


(e) SAR v souřadnicích  $x, y$  v hloubce 5 mm šťěrbinového aplikátoru

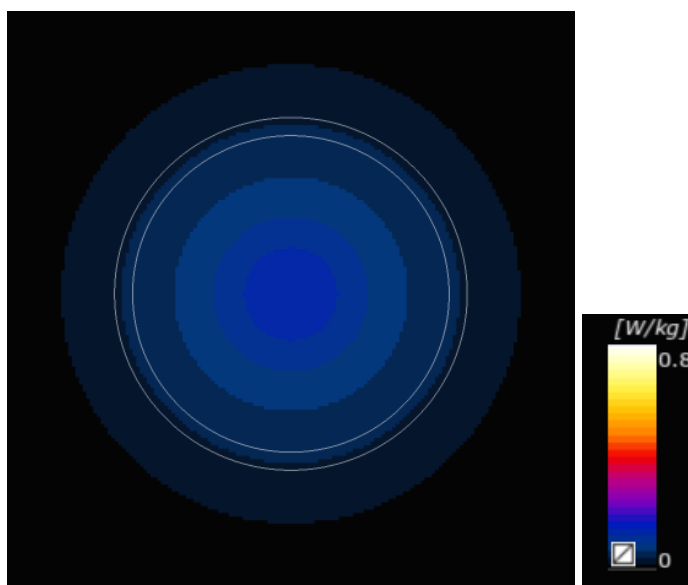
Obrázek 5.4: Profil SAR v souřadnicích  $XY$  v hloubce 5 mm



(a) SAR v souřadnicích  $x, y$  v hloubce 10 mm vyráběného aplikátoru



(c) SAR v souřadnicích  $x, y$  v hloubce 10 mm aplikátoru typu motýlek



(e) SAR v souřadnicích  $x, y$  v hloubce 10 mm šterbinového aplikátoru

Obrázek 5.5: Profil SAR v souřadnicích XY v hloubce 10 mm

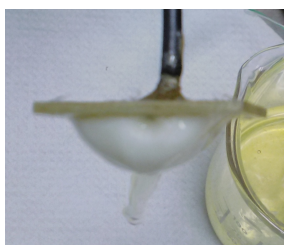
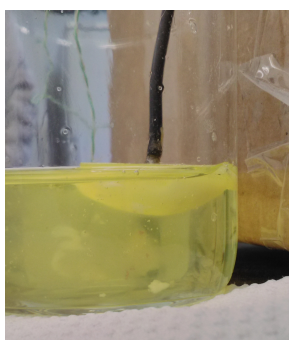
## 5.2 VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍHO MĚŘENÍ DISTRIBUCE SAR

Obrázek 5.6, Obrázek 5.7 a Obrázek 5.8 ukazují porovnání prostorové distribuce absorbovaného výkonu pro jednotlivé aplikátory při aplikaci stejného mikrovlnného výkonu po stejný čas do vaječného bílku.

Protože jsme se rozhodli pro použití aplikátoru typu motýlek, zdokumentovali jsme teplotní porfil vytvořený v agaru pomocí tohoto aplikátoru pro agarový fantom pomocí termokamery FLIR (Obrázek 5.9)



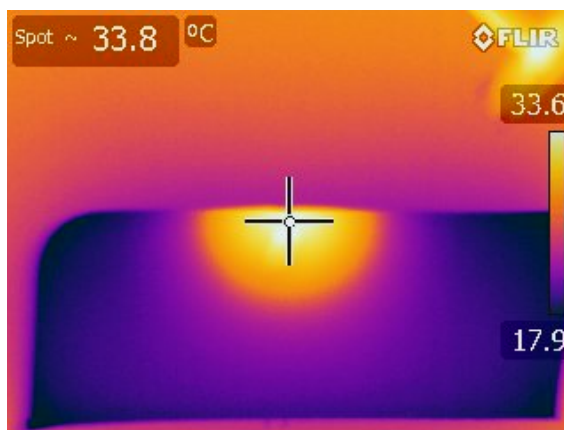
Obrázek 5.6: Vyrobený aplikátor



Obrázek 5.7: Aplikátor typu motýlek



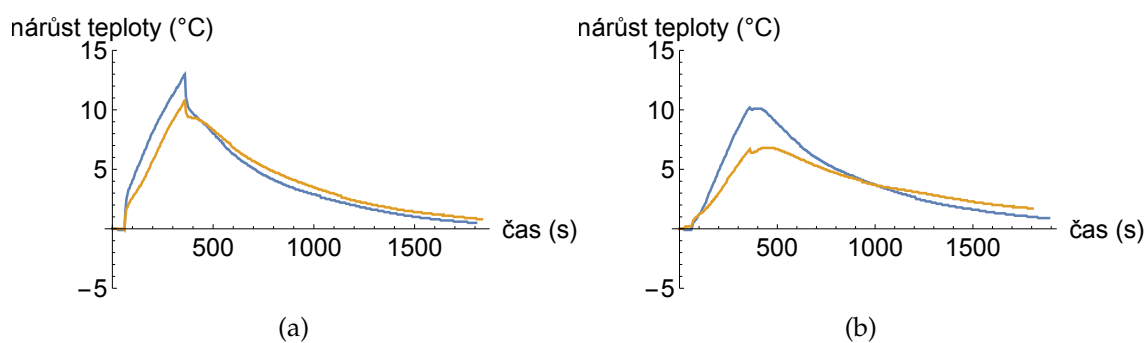
Obrázek 5.8: Štěrbínový aplikátor



Obrázek 5.9: Teplotní profil v agaru po expozici pomocí aplikátoru typu motýlek

### 5.3 EFEKT NANOČÁSTIC NA PRŮBĚH TEPLoty

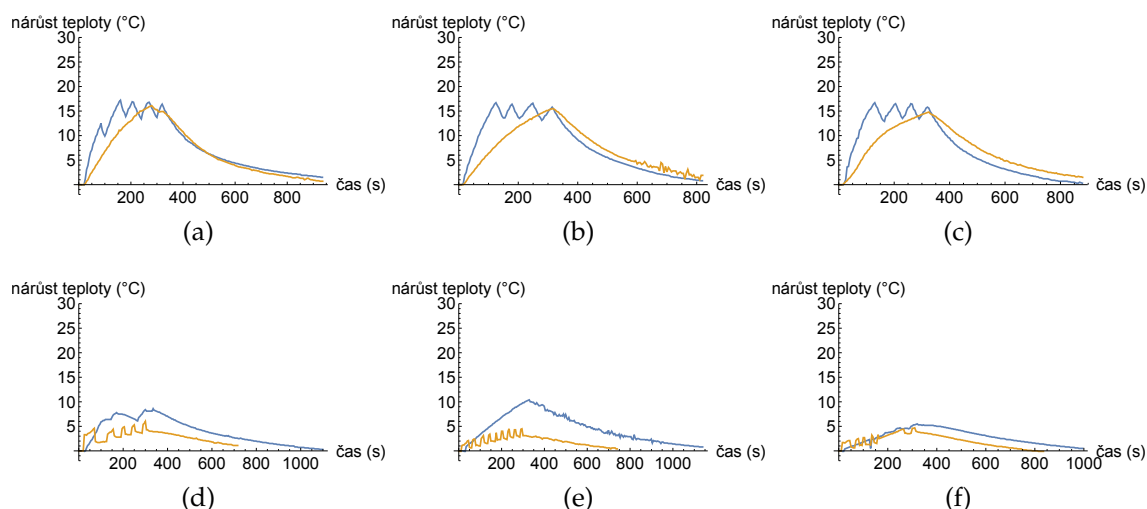
Výsledky měření časového průběhu teplot v agaru pro měření teploty ve vzdálenosti cca 12 mm od aplikátoru zachycuje [Obrázek 5.10a](#) a pro měření ve vzdálenosti 17 mm [Obrázek 5.10b](#). Na obou obrázcích modrá křivka odpovídá průběhu teploty v roztoku s nanočásticemi, zatímco oranžová křivka odpovídá průběhu teploty v roztoku s vodou.



Obrázek 5.10: Ověření tepelného efektu nanočástic ve fantomu

Výsledky měření časového průběhu teplot v hloubce 3 mm v nádoru zachycuje [Obrázek 5.11a](#), [Obrázek 5.11b](#) a [Obrázek 5.11c](#). Ve stejném řádku je vždy trojice měření provedených na stejné dvojici myši (jedna s nanočásticemi - modrá barva křivky, druhá kontrolní s PBS - oranžová barva křivky) za stejných podmínek.

Výsledky měření časového průběhu teplot v hloubce 15 mm v nádoru zachycuje [Obrázek 5.11d](#), [Obrázek 5.11e](#) a [Obrázek 5.11f](#). Uspořádání grafů a barevné označení se shoduje se sérií grafů průběhů teplot v hloubce 3 mm.

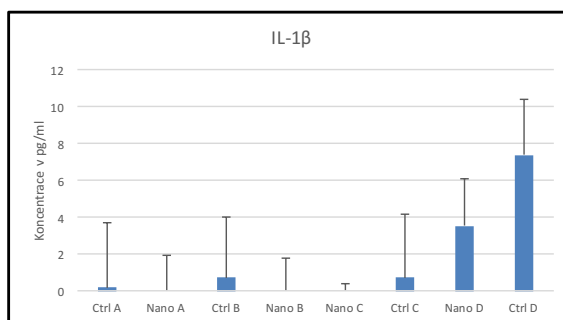


Obrázek 5.11: Ověření tepelného efektu nanočástic v nádoru v hloubce 3 mm (nahore) a 15 mm (dole).

Na periferii (v uchu) nedocházelo ke změnám teploty v žádném u kontrolních myší ani u myší s nanočásticemi.

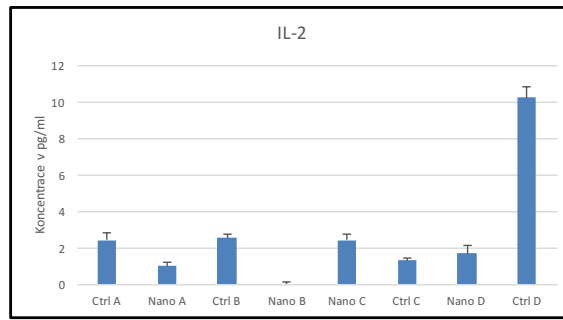
#### 5.4 VÝSLEDKY TESTU ELISA

Obrázek 5.12, Obrázek 5.14, Obrázek 5.13 a Obrázek 5.15 ukazují koncentrace jednotlivých cytokinů v krevní plazmě. Označení Ctrl odpovídá koncentracím daného cytokinu u kontrolních myší, označení Nano koncentracím daného cytokinu u myší s nanočásticemi. Označení stejným písmenem (A, B, C nebo D) rozlišuje porovnávané dvojice (kontrolní, ošetřená nanočásticemi) myší. Dvojice A, B, C byly usmrceny bezprostředně po hypertermii, dvojice D byly usmrceny po 48 hodinách po hypertermii.

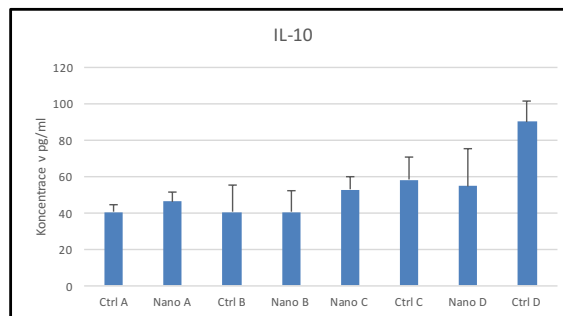


Obrázek 5.12: Koncentrace IL-1 $\beta$

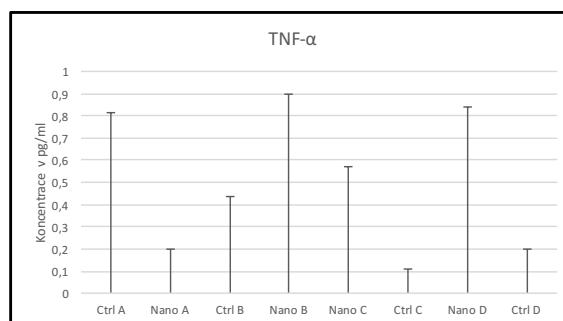




Obrázek 5.13: koncentrace IL-2



Obrázek 5.14: Koncentrace IL-10

Obrázek 5.15: Koncentrace TNF- $\alpha$

## DISKUZE

---

Z hlediska impedančního přizpůsobení se jevil jako nejlepší štěrbinový aplikátor, avšak jeho design byl navržen především pro aplikaci s vodním bolusem. Pro aplikaci bez vodního bolusu, která byla zvolena vzhledem k použitému nízkému výkonu mikrovlnného generátoru a vzhledem ke zjednodušení experimentálního nastavení umožňujícího lepší přesnost měření, se lépe hodil kompaktnější aplikátor s nižší hmotností. Proto jsme se nakonec rozhodli pro použití aplikátoru typu motýlek, který má větší šířku impedančního přizpůsobení než dipól vytvořený ze dvou čtvrtvlnných páskových vodičů.

Profil teplotního rozložení změřený termokamerou FLIR poměrně přesně odpovídal simulované predikci SAR.

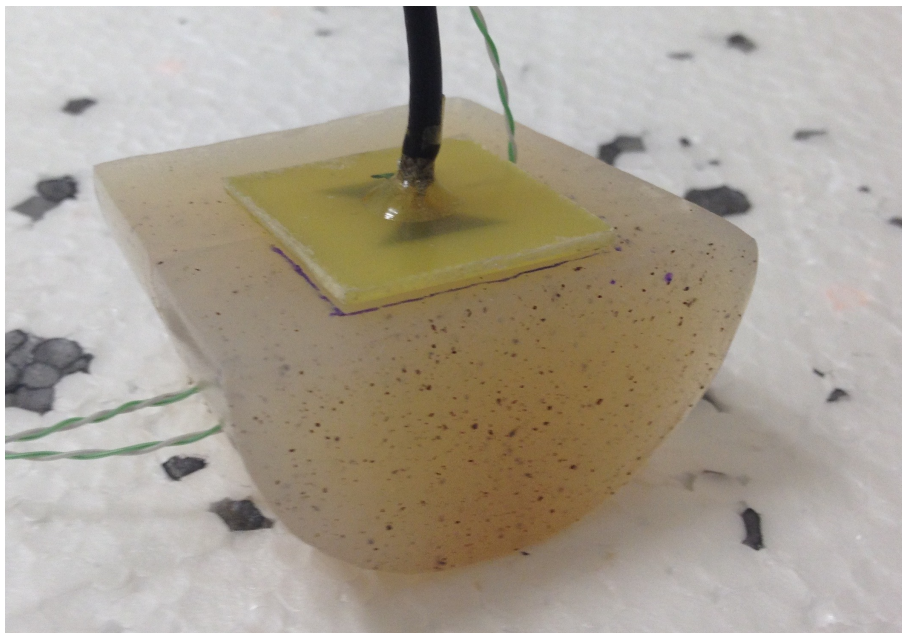
Z výsledků časového průběhu teploty měřeného v mikrozkuhavce s roztokem nanočástic umístěné v agarovém fantomu a v mikrozkuhavce s vodou umístěné v tomtéž fantomu lze usuzovat rychlejší nárůst teploty vlivem nanočástic. Tyto výsledky je však nutné ještě podpořit řadou dalších experimentů, a to z následujících důvodů:

Spolehlivost měření teploty byla v mnohých z pokusů ovlivněna interakcí kovového čidla s elektromagnetickým polem v případě, že se nepodařilo umístit čidlo kolmo ke směru vektoru intenzity elektrického pole. V tomto případě mohla vzniknout oboustranná interakce, při níž docházelo k ohřevu kovového čidla vlivem elektromagnetického pole šířícího se od aplikátoru a zároveň kovové čidlo ovlivňovalo rozložení elektromagnetického pole.

Tento efekt bylo možno rozeznat podle velké změny měřené teploty při zapnutí nebo vypnutí generátoru.

Spolehlivost při ověření tepelného účinku nanočástic mohla být ovlivněna faktem, že nanočástice mohly v některém z pokusů vytvořit sraženiny větších rozměrů, jak ukazuje [Obrázek 6.1](#), což by ovlivnilo jejich magnetické vlastnosti a chování v magnetickém poli.

Měření průběhu teploty v nádoru opět přinášelo problém nemožnosti přesného umístění termočlánků pokaždé na stejné místo, abychom porovnávali kontrol-



Obrázek 6.1: Agregované nanočástice

ní a testovaný objekt vždy za stejných podmínek. Dvojice testovaných myší navíc neměla nikdy přesně stejnou morfologii nádoru. Tento problém by v budoucích experimentech bylo možné vyřešit například měřením průběhu teploty u jedné myši před aplikací nanočástic a po aplikaci nanočástic. Tento postup by nám však znemožnil pozdější testování vlivu hypertermie s nanočásticemi na imunitní systém.

Výsledky imunologického testu ELISA naznačují (kromě  $\text{TNF-}\alpha$ , který byl pod detekčním limitem u všech myší) mírný trend zvýšené koncentrace interleukinů v krevní plazmě kontrolních myší. Domníváme se, že tento efekt mohl být zapříčiněn například příliš malým objemem případně malou koncentrací aplikovaných nanočástic. Z tohoto důvodu mohlo dojít k rychlejšímu odplavení nanočástic z nádoru, a tedy ochlazení.

## ZÁVĚR

---

Tato diplomová práce se zaměřuje na problematiku hypertermické terapie nádorů zefektivněné použitím speciálních nanočástic, obsahujících feromagnetický materiál. Zvýšením teploty v nádoru by mělo dojít ke kaskádě biologických jevů vedoucích ve výsledku k redukci nádoru.

Dle zadání této diplomové práce byl navržen a následně i realizován planární mikrovlnný aplikátor pro frekvenci 2,45 GHz. Jde o dipól tvořený dvěma pásky o celkové délce rovné polovině vlnové délky. Pro optimalizaci výroby tohoto aplikátoru byly provedeny numerické výpočty rozložení SAR ve fantomu svalové tkáně, a to s pomocí simulátoru EM pole „Sim4Life“.

Protože pro další práci byly k dispozici ještě další dva planární aplikátory, provedli jsme porovnání všech tří aplikátorů - nejprve pomocí simulací a poté i experimentálně. Celkovou bilancí výsledků experimentů (měření činitele odrazu a SAR) a ostatních faktorů (tvar, hmotnost, velikost) jsme dospěli k závěru, že nejvhodnější pro provedení hypertermie u myši bude aplikátor typu radiální dipól (tzv. „motýlek“). Tento typ dipólu má větší šířku pásma impedančního přizpůsobení než dipól vytvořený ze dvou čtvrtvlnných páskových vodičů.

Pomocí tohoto aplikátoru pak byla provedena rozsáhlá série experimentů, v nichž byly průběhy teplot ve fantomu svalové tkáně s aplikovanými nanočásticemi porovnávány s průběhem teplot ve fantomu bez nanočástic. Provedení těchto experimentů bylo zvláště náročné kvůli vysokým nárokům na přesnost (umístění termočlánků a aplikátoru) a čas (pro opakování experimentu bylo nutno vyčkat do vychladnutí fantomu). Proto jsme se zaměřili na optimalizaci těchto experimentů ([Kapitola 4](#)).

Z výsledků našich experimentů vyplývá mírně vyšší nárůst teploty u fantomu s nanočásticemi oproti fantomu bez nanočástic. Pro potvrzení těchto výsledků by bylo vhodné zopakovat měření při uvedeném experimentálním nastavení, ideálně však za použití optických čidel teploty.

Dalším z cílů práce byl též výzkum průběhu a imunitních dopadů hypertermie myší s nádory ošetřenými nanočásticemi. Nad rámec zadání byla provedena kultivace nádorových buněk, které byly později myším aplikovány.

Výsledky měření průběhů teplot v nádoru naznačují ve většině případů rychlejší nárůst teploty v případě aplikace nanočástic. Výsledky testu imunitní reakce, jež by měla korespondovat s nárůstem teploty, však tento trend zatím jednoznačně nepotvrdily.

Za přínos této diplomové práce, který vyplynul z průběhu práce, je také možné považovat návrh vhodné metodologie experimentů pro studium účinku nanočástic na biologické tkáně a také studium možnosti optimalizovat hypertermickou léčbu nádorových onemocnění s pomocí těchto nanočástic.

Podle mého názoru by bylo vhodné provést další experimenty tohoto typu, ale s větším výběrem různých druhů feromagnetických nanočástic, tj. s různým obsahem feromagnetického materiálu (pro diplomovou práci jsem měla k dispozici jen jeden typ).

Jedná se o velmi zajímavou problematiku, v jejímž výzkumu bych chtěla pokračovat (např. formou doktorského studia).

## BIBLIOGRAFIE

---

- [1] Igor Belyaev. "Nonthermal biological effects of microwaves: current knowledge, further perspective, and urgent needs". In: *Electromagnetic Biology and Medicine* 24.3 (2005), s. 375–403.
- [2] BioLegend, ed. *Mouse IL-1 $\beta$* . URL: [http://www.biolegend.com/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/432601.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/pro_detail/datasheets/432601.pdf) (cit. 14. 05. 2018).
- [3] BioLegend, ed. *Mouse IL-10*. URL: [http://www.biolegend.com/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/431411.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/pro_detail/datasheets/431411.pdf) (cit. 14. 05. 2018).
- [4] BioLegend, ed. *Mouse IL-2*. URL: [http://www.biolegend.com/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/431001.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/pro_detail/datasheets/431001.pdf) (cit. 14. 05. 2018).
- [5] BioLegend, ed. *Mouse TNF- $\alpha$* . URL: [http://www.biolegend.com/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/430901.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/pro_detail/datasheets/430901.pdf) (cit. 14. 05. 2018).
- [6] Barbara Bittová. "Superparamagnetism in nanomaterials". Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, 2008.
- [7] Zheng-Guo Cui, Jin-Lan Piao, Mati UR Rehman, Ryohei Ogawa, Peng Li, Qing-Li Zhao, Takashi Kondo a Hidekuni Inadera. "Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A". In: *European journal of pharmacology* 723 (2014), s. 99–107.
- [8] Fabienne Danhier, Olivier Feron a Véronique Préat. "To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery". In: *Journal of controlled release* 148.2 (2010), s. 135–146.
- [9] Antonio De la Hoz, Angel Diaz-Ortiz a Andres Moreno. "Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects". In: *Chemical Society Reviews* 34.2 (2005), s. 164–178.
- [10] MH Falk a RD Issels. "Hyperthermia in oncology". In: *International Journal of Hyperthermia* 17.1 (2001), s. 1–18.
- [11] Douglas Hanahan a Robert A Weinberg. "Hallmarks of cancer: the next generation". In: *cell* 144.5 (2011), s. 646–674.

- [12] Rudolf Hergt, Silvio Dutz, Robert Müller a Matthias Zeisberger. "Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy". In: *Journal of Physics: Condensed Matter* 18.38 (2006), S2919.
- [13] Jaroslav Kašpar. "Interakce nanočástic oxidů železa s Doxorubicinem". Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální fyziky, 2014.
- [14] Jaroslav Kosík. "Planární mikrovlnný aplikátor pro lokální termoterapii". Bakalářská práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, 2010.
- [15] Jiří Kubeš. "Imunomodulační účinky hypertermie v léčbě nádorů". Dizertační práce. Fakultní Nemocnice Bulovka, Ústav radiační onkologie, 2007.
- [16] Jitka Menclová. "Návrh a realizace cívek a napájecího obvodu pro hypertermii". Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky, 2017.
- [17] V Milani, E Noessner, S Ghose, M Kuppner, B Ahrens, A Scharner, R Gastpar a RD Issels. "Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation". In: *International journal of hyperthermia* 18.6 (2002), s. 563–575.
- [18] Kenneth Murphy a Casey Weaver. *Janeway's Immunobiology*. 9. vyd. Garland Science, 2017.
- [19] Martina Nováková. "Využití nanočástic pro radiofrekvenční ablaci a hypertermii v onkologických aplikacích". Dizertační práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra přírodních oborů, 2015.
- [20] MR Opp, EM Smith a TK Hughes. "Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep". In: *Journal of neuroimmunology* 60.1 (1995), s. 165–168.
- [21] M Osaci a M Cacciola. "Specific loss power in superparamagnetic hyperthermia: nanofluid versus composite". In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Sv. 163. 1. IOP Publishing. 2017, s. 012008.
- [22] Simona Partlová. "Nádorové mikroprostředí a význam protinádorové imunity pro klinický průběh lidských nádorových onemocnění". Dizertační práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2017.

- [23] Jan C Peeken, Peter Vaupel a Stephanie E Combs. “integrating Hyperthermia into Modern Radiation Oncology: what evidence is Necessary?” In: *Frontiers in oncology* 7 (2017), s. 132.
- [24] Miroslav Procházka. “TEM aplikátor pro mikrovlnnou hypertermii”. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 2010.
- [25] Lenka Rajsiglová. “Nové ferritinové nanočástice pro specifickou lokalizaci v experimentálním melanomu u myši: in vitro a in vivo testy.” Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2015.
- [26] Ilona S Smolková. “Iron Oxide Nanoparticles and Polymer Composites on Thereof for Magnetic Hyperthermia”. Doctoral Thesis. Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, 2014.
- [27] Klaus Tkotz. *Příručka pro elektrotechnika*. 2. doplněné vydání. 2006.
- [28] Paolo Togni. “Microwave Applicators for Medical and Biological purposes”. Doctoral Thesis. Czech Technical University in Prague, Faculty of Electrical Engineering, 2009.
- [29] Paolo Togni, Jan Vrba a Luca Vannucci. “Microwave applicator for hyperthermia treatment on in vivo melanoma model”. In: *Medical & biological engineering & computing* 48.3 (2010), s. 285–292.
- [30] Jiří Tuček. “Úvod do magnetismu, magnetické vlastnosti materiálů a magnetické jevy v nanosvětě”. 14. dub. 2010. URL: <http://nanosystemy.upol.cz/upload/10/tucek-uvod.pdf> (cit. 06. 05. 2018).
- [31] I Van Bruggen, TA Robertson a JM Papadimitriou. “The effect of mild hyperthermia on the morphology and function of murine resident peritoneal macrophages”. In: *Experimental and molecular pathology* 55.2 (1991), s. 119–134.
- [32] Martin Vejražka. “Buněčné kultury”. URL: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf> (cit. 06. 05. 2018).
- [33] S Velizarov, P Raskmark a S Kwee. “The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal”. In: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 48.1 (1999), s. 177–180.



- [34] Jan Vrba ml., Jan Vrba, Jiří Bouček, Martin Borovička, Miroslav Lapeš, Zdeněk Novotný a Pavel Tykal. "Planární aplikátor pro hypertermii". CS 265653 B1. 1990.
- [35] Jan Vrba. *Úvod do mikrovlnné techniky*. Vydavatelství ČVUT, 2000.
- [36] Jan Vrba. *Biologické účinky elektromagnetického pole*. Skripta. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta elektrotechnická, 2010.
- [37] Jan Vrba a Miroslav Lapeš. *Mikrovlnné aplikátory pro lékařské účely*. Vydavatelství ČVUT, 1995.
- [38] Li-Mou Zheng, David M Ojcius, F Garaud, C Roth, E Maxwell, Z Li, H Rong, J Chen, XY Wang, JJ Catino et al. "Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism." In: *Journal of Experimental Medicine* 184.2 (1996), s. 579–584.